

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. September 2008 (04.09.2008)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2008/104559 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 15/82 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01) A23D 9/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für

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

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/052358

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Februar 2008 (27.02.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
07103183.5 27. Februar 2007 (27.02.2007) EP

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für

jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **NORDDEUTSCHE PFLANZENZUCHT** [DE/DE]; Hohenlieth, 24363 Holtsee (DE). **GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN** [DE/DE]; Wilhelmsplatz 1, 37073 Göttingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ABBADI, Amine** [DE/DE]; Lindentor, 24214 Gettorf (DE). **FEUSSNER, Ivo** [DE/DE]; Calsowstrasse 12, 37085 Göttingen (DE). **HOFFMANN, Mareike** [DE/DE]; Hanssenstrasse 26, 37073 Göttingen (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

(74) Anwalt: **LASAR, Andrea**; Maiwald Patentanwalts GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).

(54) Title: METHOD FOR THE PRODUCTION OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN TRANSGENIC ORGANISMS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON MEHRFACH UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN IN TRANSGENEN ORGANISMEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing polyunsaturated fatty acids, particularly long-chain polyunsaturated fatty acids such as arachidonic acid and/or eicosapentaenoic acid, in a transgenic organism by introducing nucleic acid that code for polypeptides having Δ -6 desaturase, Δ -6 elongase, and/or Δ -5 desaturase activity into the organism. Advantageously, the Δ -6 desaturase and the Δ -5 desaturase are obtained from *Mantoniella squamata* while the Δ -6 elongase is obtained from *Physcomitrella patens*. Advantageously, a gene coding for a ω -3 desaturase is also expressed in the organism. In another advantageous embodiment of said method, other nucleic acid sequences coding for polypeptides of fatty acid and lipid metabolism biosynthesis can be expressed in the organism. The nucleic acid sequences coding for a Δ -8 desaturase, Δ -12 desaturase, Δ -15 desaturase, Δ -4 desaturase, Δ -9 elongase, and/or Δ -5 elongase activity are particularly advantageous therefor.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Arachidonsäure und/oder Eicosapentaensäure, in einem transgenen Organismus, indem Nucleinsäuren in den Organismus eingebracht werden, die für Polypeptide mit delta-6-Desaturase-, delta-6-Elongase- und/oder delta-5-Desaturase-Aktivität kodieren. Vorteilhaft stammen die delta-6-Desaturase und die delta-5-Desaturase aus *Mantoniella squamata* und die delta-6-Elongase aus *Physcomitrella patens*. Vorteilhaft wird in dem Organismus weiterhin ein Gen, das für eine omega-3-Desaturase kodiert, exprimiert. In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens können weitere Nucleinsäuresequenzen, die für Polypeptide der Biosynthese des Fettsäure- und Lipidstoffwechsels kodieren, in dem Organismus exprimiert werden. Besonders vorteilhaft sind hierfür die Nucleinsäuresequenzen, die für eine delta-8-Desaturase-, delta-12-Desaturase-, delta-15-Desaturase, delta-4-Desaturase, delta-9-Elongase- und/oder delta-5-Elongase-Aktivität kodieren.

WO 2008/104559 A1

Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in transgenen Organismen

- Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie Arachidonsäure und/oder Eicosapentaensäure, in einem transgenen Organismus, indem Nukleinsäuren in den Organismus eingebracht werden, die für Polypeptide mit $\Delta 6$ -Desaturase, $\Delta 6$ -Elongase- und/oder $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität kodieren. Vorteilhaft stammen die $\Delta 6$ -Desaturase und die $\Delta 5$ -Desaturase aus *Mantoniella squamata* und die $\Delta 6$ -Elongase aus *Physcomitrella patens*.
- Vorteilhaft wird in dem Organismus weiterhin ein Gen, das für eine $\omega 3$ -Desaturase kodiert, exprimiert. In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens können weitere Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide der Biosynthese des Fettsäure- und Lipidstoffwechsels kodieren, in dem Organismus exprimiert werden. Besonders vorteilhaft sind hierfür die Nukleinsäuresequenzen, die für eine $\Delta 8$ -Desaturase-, $\Delta 12$ -Desaturase-, $\Delta 15$ -Desaturase-, $\Delta 4$ -Desaturase-, $\Delta 9$ -Elongase- und/oder $\Delta 5$ -Elongase-Aktivität kodieren. Die Erfindung betrifft weiterhin die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen und/oder die Nukleinsäurekonstrukte sowie transgene Organismen enthaltend die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Ölen, Lipiden und/oder Triacylglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Öle, Lipide und/oder Fettsäuren hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren und deren Verwendung, insbesondere die Verwendung in Futter- oder Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.
- Fettsäuren und Triacylglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem, ob es sich um freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren oder um Triacylglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure sind für Säuge-

- 2 -

tiere essentiell, da sie nicht von diesen selbst hergestellt werden können. Deshalb sind mehrfach ungesättigte ω 3-Fettsäuren und ω 6-Fettsäuren ein wichtiger Bestandteil der tierischen und menschlichen Nahrung.

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

Aufgrund der heute üblichen Zusammensetzung der menschlichen Nahrung ist ein Zusatz von mehrfach ungesättigten ω 3-Fettsäuren, die bevorzugt in Fischölen vorkommen, zur Nahrung

15 besonders wichtig. So werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren DHA oder EPA Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Der ungesättigten Fettsäure DHA wird dabei ein positiver Effekt auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Gehirnfunktionen zugeschrieben.

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

Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie

25 *Mortierella* oder *Schizochytrium* oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja oder Raps, Algen

- 3 -

wie *Cryptocodinium* oder *Phaeodactylum* und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form ihrer Triacylglyceride (= Triglyceride = Triglycerole) anfallen. Sie können aber auch aus Tieren wie z.B. Fischen gewonnen werden. Die freien Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung hergestellt. Sehr langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie DHA, EPA, Arachidonsäure (= ARA, C20:4^{Δ5,8,11,14}), Dihomo-γ-linolensäure (C20:3^{Δ8,11,14}) oder Docosapentaensäure (DPA, C22:5^{Δ7,10,13,16,19}) werden in Ölfrüchtpflanzen wie Raps, Soja, Sonnenblume, Färbersaflor nicht synthetisiert. Übliche natürliche Quellen für diese Fettsäuren sind Fische wie Hering, Lachs, Sardine, Goldbarsch, Aal, Karpfen, Forelle, Heilbutt, Makrele, Zander oder Thunfisch oder Algen.

10

Je nach Anwendungszweck werden Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt. So werden z.B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fettsäuren, insbesondere mehrfach ungesättigten Fettsäuren bevorzugt. Den mehrfach ungesättigten ω3-Fettsäuren wird dabei ein positiver Effekt auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Möglichkeit der Prävention einer Herzerkrankung zugeschrieben. Durch Zugabe dieser ω3-Fettsäuren zur Nahrung kann das Risiko einer Herzerkrankung, eines Schlaganfalls oder von Bluthochdruck deutlich verringert werden. Auch entzündliche, speziell chronisch entzündliche Prozesse im Rahmen immunologischer Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis lassen sich durch ω3-Fettsäuren positiv beeinflussen. Sie werden deshalb Lebensmitteln, speziell diätetischen Lebensmitteln zugegeben oder finden in Medikamenten Anwendung.

20

ω3- und ω6-Fettsäuren sind Vorläufer von Gewebshormonen, den sogenannten Eicosanoiden wie den Prostaglandinen, die sich von der Dihomo-γ-linolensäure, der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten, und den Thromboxanen und Leukotrienen, die sich von der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten. Eicosanoide (sog. PG₂-Serie), die aus ω6-

25

- 4 -

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

Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 eine Δ 9-Desaturase beschrieben, in WO 93/11245 eine Δ 15- Desaturase und in WO 94/11516 eine Δ 12-Desaturase. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659 beschrieben. In der Regel erfolgt die Charakterisierung membrangebundener Desaturasen durch Einbringung in einen geeigneten Organismus, der anschließend auf Enzymaktivität mittels Edukt- und Produktanalyse untersucht wird. Δ 6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, US 5,614,393, WO 96/21022, WO 00/21557 und WO 99/27111 beschrieben und auch die Anwendung zur Produktion in transgenen Organismen ist beschrieben wie in WO 98/46763 WO 98/46764, WO 98/46765. Dabei wird auch die Expression verschiedener Desaturasen wie in WO 99/64616 oder WO 98/46776 und die Bildung mehrfach ungesättigter Fettsäuren beschrieben.

20

Die polyungesättigten Fettsäuren können entsprechend ihrem Desaturierungsmuster in zwei große Klassen, die ω 6- oder ω 3-Fettsäuren eingeteilt werden, die metabolisch und funktionell unterschiedlich Aktivitäten haben (Fig. 1).

- 5 -

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

5

Säugetiere und damit auch der Mensch verfügen über keine entsprechende Desaturaseaktivität ($\Delta 12$ - und ω 3-Desaturase) und müssen diese Fettsäuren (essentielle Fettsäuren) über die Nahrung aufnehmen. Über die Abfolge von Desaturase- und Elongase-Reaktionen werden dann aus diesen Vorstufen die physiologisch wichtigen polyungesättigten Fettsäuren ARA, eine ω 6-Fettsäure, und die beiden ω 3-Fettsäuren EPA und DHA synthetisiert. Die Applikation von ω 3-Fettsäuren zeigt dabei die oben beschriebene therapeutische Wirkung bei der Behandlung von Herz-Kreislaufkrankheiten.

Die Verlängerung von Fettsäuren durch Elongasen um 2 bzw. 4 C-Atome ist für die Produktion von C20- bzw. C22-PUFAs von entscheidender Bedeutung. Dieser Prozess verläuft über 4 Stufen. Der erste Schritt stellt die Kondensation von Malonyl-CoA an das Fettsäure-Acyl-CoA durch die Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS, im weiteren Text als Elongase bezeichnet). Es folgt dann ein Reduktionsschritt (Ketoacyl-CoA-Reduktase, KCR), ein Dehydratationsschritt (Dehydratase) und ein abschließender Reduktionsschritt (Enoyl-CoA-Reduktase). Es wurde postuliert, dass die Aktivität der Elongase die Spezifität und Geschwindigkeit des gesamten Prozesses beeinflusst.

Die bisher bekannten Verfahren zur Herstellung von ARA und/oder EPA besitzen einige Nachteile. In der Regel werden beide Fettsäuren als ein Gemisch in den Verfahren erhalten. Das einzige bekannte Verfahren zur Herstellung von Arachidonsäure mit geringen Anteilen an EPA

25

- 6 -

ist ein pilzliches, fermentatives Verfahren. Dies ist eine Ölquelle, die aus ernährungsphysiologischer Sicht suboptimal ist, da sie Fettsäuren enthält, die in der menschlichen Nahrung sonst nicht vorkommen. Als weitere Arachidonsäurequelle kommen Eilipide in Frage. Diese enthalten allerdings hohe Phospholipidanteile wie Cholesterin, die für eine breite Verwendung in
5 Nahrungsmitteln eher nachteilig sind.

Höhere Pflanzen enthalten mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure (C18:2) und Linolensäure (C18:3). ARA, EPA und/oder DHA kommen im Samenöl höherer Pflanzen gar nicht oder nur in Spuren vor. Es wäre jedoch vorteilhaft, in höheren Pflanzen, bevorzugt in
10 Ölsaaten wie Raps, Lein, Sonnenblume und Soja, LCPUFAs herzustellen, da auf diese Weise große Mengen qualitativ hochwertiger LCPUFAs für die Lebensmittelindustrie, die Tierernährung und für pharmazeutische Zwecke kostengünstig gewonnen werden können. Hierzu müssen vorteilhaft über gentechnische Methoden Gene kodierend für Enzyme der Biosynthese von LCPUFAs in Ölsaaten eingeführt und exprimiert werden. Dies sind Gene, die beispielsweise
15 für $\Delta 6$ -Desaturasen, $\Delta 6$ -Elongasen, $\Delta 5$ -Desaturasen oder $\Delta 4$ -Desaturasen kodieren. Diese Gene können vorteilhaft aus Mikroorganismen und niederen Pflanzen isoliert werden, die LCPUFAs herstellen und in Membranen oder Triacylglyceride einbauen. So konnten bereits $\Delta 6$ -Desaturase-Gene aus dem Moos *Physcomitrella patens* und $\Delta 6$ -Elongase-Gene aus *P. patens* und dem Nematoden *C. elegans* isoliert werden.

20 Erste transgene Pflanzen, die Gene kodierend für Enzyme der LCPUFA-Biosynthese enthalten und exprimieren und LCPUFAs produzieren wurden beispielsweise in DE 102 19 203 erstmals beschrieben. Diese Pflanzen produzieren allerdings LCPUFAs in Mengen, die für eine Aufarbeitung noch weiter optimiert werden müssen.

25

- 7 -

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

5

Es bestand daher die Aufgabe ein einfaches, kostengünstiges, wirtschaftliches Verfahren zur Herstellung von ARA und/oder EPA zu entwickeln, das die vorgenannten Nachteile nicht hat. Außerdem sollte ein solches Verfahren die Synthese der Fettsäuren preiswert in nahezu beliebigen Mengen ermöglichen. Neben den Wertprodukten ARA und/oder EPA sollten

10 möglichst wenige andere PUFAs, vorteilhaft nur entweder ω 3- oder ω 6-Fettsäuren, vorteilhaft nur ω 3 Fettsäuren enthalten sein.

Eine weitere Aufgabe bestand darin weitere Gene bzw. Enzyme, die für die Synthese von LCPUFAs geeignet sind, speziell Gene, die für eine Δ 5-Desaturase- oder Δ 6-Desaturaseaktivität

15 kodieren, für die Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zur Verfügung zu stellen.

Eine weitere Aufgabe dieser Erfindung war die Bereitstellung von Genen bzw. Enzymen, die eine Verschiebung von den ω 6-Fettsäuren zu den ω 3-Fettsäuren hin ermöglichen.

20 Die Aufgaben der Erfindung wurden u. a. durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Arachidonsäure oder Eicosapentaensäure in transgenen Organismen gelöst, dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt an Arachidonsäure und/oder Eicosapentaensäure in dem transgenen Organismus mindestens 1 Gew.-% bezogen auf den Gesamtlipidgehalt des transgenen Organismus ausmacht und das Verfahren folgende/n Verfahrensschritt/e umfasst:

- 8 -

- a) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer Δ -6-Desaturase kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, und Derivaten der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide kodieren, die auf Aminosäureebene mindestens 40% Identität mit SEQ ID NO:2 aufweisen und eine Δ 6-Desaturaseaktivität haben, und/oder
- 5
- b) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer Δ -5-Desaturase kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Sequenz, Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, und Derivaten der in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide kodieren, die auf Aminosäureebene mindestens 40% Identität mit SEQ ID NO:4 aufweisen und eine Δ -5-Desaturaseaktivität haben.
- 10
- 15

Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von ω 3-Fettsäuren in transgenen Organismen,

dadurch gekennzeichnet, dass es folgende/n Verfahrensschritt/e umfasst:

- 20 a) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer Δ -6-Desaturase kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, und Derivaten der in SEQ ID NO:1 dargestellten

- 9 -

Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide kodieren, die auf Aminosäureebene mindestens 40% Identität mit SEQ ID NO:2 aufweisen und eine Δ -6-Desaturaseaktivität haben, und/oder

- b) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer Δ -5-Desaturase kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Sequenz, Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, und Derivaten der in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide kodieren, die auf Aminosäureebene mindestens 40% Identität mit SEQ ID NO:4 aufweisen und eine Δ -5-Desaturaseaktivität haben.

Vorteilhaft werden jeweils die Schritte a) und b) durchgeführt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird neben der erfindungsgemäßen Δ -6-Desaturaseaktivität und der erfindungsgemäßen Δ -5-Desaturaseaktivität eine Δ -6-Elongaseaktivität in den Organismus eingebracht. Bevorzugt handelt es sich bei dem Organismus um einen Mikroorganismus, eine Hefe oder eine Pflanze, wobei Nutzpflanzen besonders bevorzugt sind.

Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit der Aktivität einer Δ -6-Elongase kodieren, und im Rahmen der Erfindung eingesetzt werden können, sind bspw. beschrieben in WO 2007/017419, WO 2006/069710, WO 2006/100241, WO 2005/083053, WO2006/069936, WO2005/12316, Domergue et al. (2002) Eur J Biochem 269: 4105-4113; Girke et al. (1998) Plant J 15: 39-48. Bevorzugt handelt es sich bei der Δ -6-Elongase um eine Δ -6-Elongase aus dem Moos *Physcomitrella patens*, wie sie beispielsweise in Zank et al. (2002) Plant J. 31:255-268 beschrieben ist. Besonders bevorzugt weist die Δ -6-Elongase die in SEQ ID No. 14 angegebene Aminosäuresequenz auf.

- 10 -

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird in die Organismen, speziell die Pflanzen, zusätzlich eine Nukleinsäuresequenz, die für eine ω -3-Desaturase kodiert, eingebracht. Geeignete Nukleinsäuresequenzen, die für eine ω -3-Desaturase kodieren, sind bspw. beschrieben in WO 2007/017419, WO 2006/069710, WO 2006/100241, WO 2005/083053, Michaelson et al.
5 (1998) J Biol Chem 273: 19055-19059; Kaewsuwan et al. (2006) J Biol Chem. 281: 21988-97.

Im übrigen kann der Fachmann geeignete Sequenzen der gängigen wissenschaftlichen Literatur sowie insbesondere den Gendatenbanken entnehmen und im Sinne dieser Erfindung einsetzen.

10 Vorteilhaft enthalten die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren ARA und/oder EPA und weitere LCPUFAs der ω -3- oder ω -6-Fettsäurereihe mit mindestens zwei, vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Besonders vorteilhaft enthalten die Fettsäuren vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Im Verfahren hergestellte
15 die Fettsäuren haben vorteilhaft 18, 20 oder 22 C-Atome in der Fettsäurekette, bevorzugt enthalten die Fettsäuren 20 oder 22 Kohlenstoffatome in der Fettsäurekette. Vorteilhaft handelt es sich um ARA und/oder EPA.

Vorteilhaft werden gesättigte Fettsäuren mit den im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren wenig oder gar nicht, vorteilhaft gar nicht umgesetzt. Unter wenig ist zu verstehen, dass im Vergleich zu
20 mehrfach ungesättigten Fettsäuren die gesättigten Fettsäuren mit weniger als 5 % der Aktivität, vorteilhaft weniger als 3 %, besonders vorteilhaft mit weniger als 2 %, ganz besonders bevorzugt mit weniger als 1, 0,5, 0,25 oder 0,125 % der Aktivität umgesetzt werden. Diese neben den im Verfahren hergestellten Fettsäuren ARA und/oder EPA hergestellten Fettsäuren können als
25 einzelne Fettsäuren zusätzlich im Verfahren hergestellt werden oder in einem Fettsäuregemisch vorliegen.

- 11 -

Unter " ω 3-Fettsäuren" werden im Rahmen der Erfindung solche ungesättigten Fettsäuren verstanden, bei denen die letzte Doppelbindung in der Kohlenstoffkette bei der vom Carboxylende aus gesehen drittletzten Kohlenstoffbindung vorliegt. Beispiele für ω 3-Fettsäuren sind α -Linolensäure (18:3 ^{Δ 9,12,15}), Eicosapentaensäure (EPA; 20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17}) und
5 Docosahexaensäure (DHA; 22:6 ^{Δ 4,7,10,13,16,19}). Weitere ω 3-Fettsäuren sind dem Fachmann bekannt.

Bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren überwiegend ω 3-Fettsäuren hergestellt, d.h. das Verhältnis von hergestellten ω 3-Fettsäuren zu hergestellten ω 6-Fettsäuren beträgt mindestens
10 5:1, 6:1 oder 7:1, bevorzugt mindestens 8:1, 9:1 oder 10:1, besonders bevorzugt mindestens 12:1, 15:1, 18:1 oder 20:1. Am meisten bevorzugt werden durch das erfindungsgemäße Verfahren keine ω 6-Fettsäuren hergestellt. Somit besitzen die erfindungsgemäßen Δ -6-Desaturasen und Δ -5-Desaturasen aus *Mantoniella squamata* gegenüber den Desaturasen des Standes der Technik wie beispielsweise den Desaturasen aus *Ostreococcus tauri* und *Phaeodactylum tricornutum* den
15 Vorteil der ω 3-Spezifität (siehe beispielsweise Abbildungen 15 und 16).

Vorteilhaft werden die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen, die für Δ -6-Desaturasen, Δ -5-Desaturasen und/oder Δ -6-Elongasen und/oder ω -Desaturasen kodieren, in Kombination mit weiteren Genen des Fettsäure- und/oder Lipidstoffwechsels exprimiert, wie z.B. Nuklein-
20 säuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -8-Desaturase-, Δ -12-Desaturase-, Δ -15-Desaturase-, Δ -4-Desaturase-, Δ -9-Elongase- und/oder Δ -5-Elongaseaktivität kodieren.

Geeignete Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -5-Elongase-, Δ -12-Desaturase- oder Δ -4-Desaturaseaktivität kodieren, sind beschrieben in WO 2006/069710, WO 2006/100241,
25 WO 2005/083053, WO2006/069936, WO2005/012316, Meyer et al. (2004) J. Lipid Res. 45:

- 12 -

1899-1909, Meyer et al. (2003) Biochemistry 42: 9779-88. Die Aminosäuresequenz einer geeigneten Δ -5-Elongase ist auch in SEQ ID No. 16 angegeben.

5 Im übrigen kann der Fachmann geeignete Sequenzen der gängigen wissenschaftlichen Literatur sowie insbesondere den Gendatenbanken entnehmen und im Sinne dieser Erfindung einsetzen. Dies gilt auch für die anderen im Rahmen dieser Erfindung nützlichen Gene für Enzyme, die an der Fettsäure- und Lipidbiosynthese beteiligt sind.

10 Vorteilhaft werden die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren in transgenen Pflanzen im vegetativen Gewebe (= somatischem Gewebe) exprimiert. Unter vegetativem Gewebe ist im Sinne dieser Erfindung zu verstehen, dass das Gewebe dadurch gekennzeichnet ist, das es sich durch mitotische Teilungen vermehrt. Derartiges Gewebe entsteht auch durch asexuelle Fortpflanzung (= Apomixis) und Vermehrung. Von Vermehrung spricht man dann, wenn sich die Zahl der Individuen in aufeinander folgenden Generationen erhöht. Diese durch asexuelle Vermehrung entstandenen Individuen sind mit ihren Eltern weitestgehend identisch. 15 Beispiele für derartige Gewebe sind Blatt, Blüte, Wurzel, Stengel, oberirdische oder unterirdische Ausläufer (Seitensprosse, Stolonen), Rhizome, Knospen, Knollen wie Wurzelknollen oder Ausläuferknollen, Zwiebel, Brutkörper, Brutknospen, Bulbillen oder Turione. Derartige Gewebe können auch durch unechte, echte oder durch den Mensch verursachte Viviparie entstehen. Aber 20 auch Samen, die durch Agamospermie, wie sie für Asteraceae, Poaceae oder Rosaceae typisch sind, entstanden sind, gehören zu den vegetativen Geweben, in denen vorteilhaft die Expression stattfindet. Zu einem geringeren Teil oder gar nicht werden die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren im generativen Gewebe (Keimbahngewebe) exprimiert. Unter generativem Gewebe ist im Sinne dieser Erfindung zu verstehen, dass das Gewebe sich durch 25 meiotische Teilung bildet. Beispiele für derartige Gewebe sind Gewebe, die durch geschlecht-

- 13 -

liche Fortpflanzung, d.h. meiotische Zellteilungen entstehen, wie z.B. Samen, die durch geschlechtliche Prozesse entstanden sind. Unter zu einem geringen Teil ist zu verstehen, dass im Vergleich zum vegetativen Gewebe die Expression gemessen auf RNA- und/oder Proteinebene weniger als 5 %, vorteilhaft weniger als 3 %, besonders vorteilhaft weniger als 2 %, ganz besonders bevorzugt weniger als 1, 0,5, 0,25 oder 0,125 % beträgt.

Die im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind vorteilhaft in Membranlipiden und/oder Triacylglyceriden gebunden, können aber auch als freie Fettsäuren oder aber gebunden in Form anderer Fettsäureester in den Organismen vorkommen. Dabei können sie als "Reinprodukte" oder aber vorteilhaft in Form von Mischungen verschiedener Fettsäuren oder Mischungen unterschiedlicher Phospholipide wie Phosphatidylglycol, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und/oder Phosphatidylserin und/oder Triacylglyceride, Monoacylglyceride und/oder Diacylglyceride vorliegen. Vorteilhaft liegen die im Verfahren hergestellten LCPUFAs ARA und/oder EPA im Phosphatidylcholin und/oder Phosphatidylethanolamin und/oder in den Triacylglyceriden vor. Die Triacylglyceride können außerdem noch weitere Fettsäuren enthalten wie kurzkettige Fettsäuren mit 4 bis 6 C-Atomen, mittelkettige Fettsäuren mit 8 bis 12 C-Atomen oder langkettigen Fettsäuren mit 14 bis 24 C-Atomen, bevorzugt enthalten sie langkettige Fettsäuren, besonders bevorzugt sind die langkettigen Fettsäuren LCPUFAs von C18-, C20- oder C22-Fettsäuren.

20

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden vorteilhaft Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C18-, C20- und/oder C22-Fettsäuremolekülen mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäureester, vorteilhaft mit mindestens drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäureester, besonders vorteilhaft von mindestens fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäureester hergestellt und führen vorteilhaft zur Synthese von Linolsäure (=LA, C18:2 Δ 9,12), γ -Linolen-

25

- 14 -

säure (= GLA, C18:3 Δ 6,9,12), Stearidonsäure (= SDA, C18:4 Δ 6,9,12,15), Dihomo- γ -Linolensäure (= DGLA, 20:3 Δ 8,11,14), ω -3-Eicosatetraensäure (= ETA, C20:4 Δ 5,8,11,14), Arachidonsäure (ARA, C20:4 Δ 5,8,11,14), Eicosapentaensäure (EPA, C20:5 Δ 5,8,11,14,17), ω -6-Docosapentaensäure (C22:5 Δ 4,7,10,13,16), ω -6-Docosatetraensäure (C22:4 Δ 7,10,13,16),
5 ω -3-Docosapentaensäure (= DPA, C22:5 Δ 7,10,13,16,19), Docosahexaensäure (= DHA, C22:6 Δ 4,7,10,13,16,19) oder deren Mischungen, bevorzugt ARA und/oder EPA. Ganz besonders bevorzugt wird die ω -3-Fettsäure EPA hergestellt.

Die Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C18-, C20- und/oder C22-Fettsäuremolekülen
10 können aus den Organismen, die für die Herstellung der Fettsäureester verwendet wurden, in Form eines Öls oder Lipids beispielsweise in Form von Verbindungen wie Sphingolipiden, Phosphoglyceriden, Lipiden, Glycolipiden wie Glycosphingolipiden, Phospholipiden wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol oder Diphosphatidylglycerol, Monoacylglyceride, Diacylglyceride,
15 Triacylglyceride oder sonstigen Fettsäureestern wie die AcetylCoenzymA-Ester, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei, drei, vier, fünf oder sechs bevorzugt fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten, isoliert werden, vorteilhaft werden sie in der Form ihrer Diacylglyceride, Triacylglyceride und/oder in Form des Phosphatidylcholin isoliert, besonders bevorzugt in der Form der Triacylglyceride. Neben diesen Estern sind die mehrfach ungesättigten
20 Fettsäuren auch als freie Fettsäuren oder gebunden in anderen Verbindungen in den Organismen vorteilhaft den Pflanzen enthalten. In der Regel liegen die verschiedenen vorgenannten Verbindungen (Fettsäureester und freie Fettsäuren) in den Organismen in einer ungefähren Verteilung von 80 bis 90 Gew.-% Triglyceride, 2 bis 5 Gew.-% Diglyceride, 5 bis 10 Gew.-% Monoglyceride, 1 bis 5 Gew.-% freie Fettsäuren, 2 bis 8 Gew.-% Phospholipide vor, wobei
25 sich die Summe der verschiedenen Verbindungen zu 100 Gew.-% ergänzt.

- 15 -

Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die hergestellten LCPUFAs mit einem Gehalt von mindestens 1, 2, 3 oder 4 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 Gew.-%, bevorzugt von mindestens 11, 12, 13, 14 oder 15 Gew.-%, besonders bevorzugt von mindestens 16, 17, 18, 19 oder 20 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt von mindestens 25, 30, 35 oder
5 40 Gew.-% bezogen auf die gesamten Fettsäuren in den transgenen Organismen, vorteilhaft in einer transgenen Pflanze hergestellt.

Dabei sind die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäuren ARA und/oder EPA mit einem Gehalt von mindestens 10 Gew.-% . bevorzugt von mindestens 11, 12, 13, 14 oder
10 15 Gew.-%, besonders bevorzugt von mindestens 16, 17, 18, 19, oder 20 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt von mindestens 25, 26, 27, 28, 29, 30 oder 31 Gew.-%, am meisten bevorzugt von mindestens 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 , 42, 43, 44 oder 45 Gew.-% bezogen auf die gesamten Fettsäuren in den Triacylglyceriden und/oder Phosphatidylglyceriden vorteilhaft im Phosphatidylcholin enthalten. Vorteilhaft werden die Fettsäuren in gebundener
15 Form hergestellt. Mit Hilfe der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren lassen sich diese ungesättigten Fettsäuren an sn1-, sn2- und/oder sn3-Position der vorteilhaft hergestellten Triglyceride bringen. Vorteilhaft sind mindestens 11 % der Triacylglyceride doppelt substituiert, das heißt an sn1- und sn2- oder sn2- und sn3-Position substituiert. Auch dreifach substituierte Triacylglyceride sind nachweisbar. Da im erfindungsgemäßen Verfahren von den
20 Ausgangsverbindungen Linolsäure (C18:2) bzw. Linolensäure (C18:3) mehrere Reaktionsschritte durchlaufen werden, fallen die Endprodukte des Verfahrens wie beispielsweise Arachidonsäure (ARA) oder Eicosapentaensäure (EPA) nicht als absolute Reinprodukte an, es sind immer auch Spuren oder größere Mengen der Vorstufen im Endprodukt enthalten. Sind in der Ausgangspflanze beispielsweise sowohl Linolsäure als auch Linolensäure vorhanden, so liegen die
25 Endprodukte wie ARA oder EPA als Mischungen vor. Die Vorstufen sollten vorteilhaft nicht

- 16 -

mehr als 20 Gew.-%, bevorzugt nicht mehr als 15 Gew.-%, besonders bevorzugt nicht als 10 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt nicht mehr als 5 Gew.-%, bezogen auf die Menge des jeweiligen Endprodukts betragen. Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren in einer transgenen Pflanze als Endprodukte nur ARA oder EPA gebunden oder als freie Säuren
5 hergestellt.

Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, enthalten vorteilhaft 6 bis 15 % Palmitinsäure, 1 bis 6 % Stearinsäure; 7 - 85 % Ölsäure; 0,5 bis 8 % Vaccensäure, 0,1 bis 1 % Arachinsäure, 7 bis 25 % gesättigte Fettsäuren, 8 bis 85 %
10 einfach ungesättigte Fettsäuren und 60 bis 85 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren, jeweils bezogen auf 100 % und auf den Gesamtfettsäuregehalt der Organismen. Als vorteilhafte mehrfach ungesättigte Fettsäure sind in den Fettsäureestern bzw. Fettsäuregemischen bevorzugt mindestens 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 oder 1 % bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt an Arachidonsäure enthalten. Weiterhin enthalten die Fettsäureester bzw. Fettsäure-
15 gemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, vorteilhaft Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe der Fettsäuren Erucasäure (13- Docosaensäure), Sterculinsäure (9,10-Methylene octadec-9-enonsäure), Malvalinsäure (8,9-Methylen Heptadec-8-enonsäure), Chaulmoogrinsäure (Cyclopentendodecansäure), Furan-Fettsäure (9,12-Epoxy-octadeca-9,11-dienonsäure), Vernonsäure (9,10-Epoxyoctadec-12-enonsäure), Tarinsäure (6-Octadecynon-
20 säure), 6-Nonadecynonsäure, Santalbinsäure (t11-Octadecen-9-ynoic acid), 6,9-Octadecenynonsäure, Pyrulinsäure (t10-Heptadecen-8-ynonsäure), Crepenyninsäure (9-Octadecen-12-ynonsäure), 13,14-Dihydrooropheinsäure, Octadecen-13-ene-9,11-diyonsäure, Petroselensäure (cis-6-Octadecenonsäure), 9c,12t-Octadecadiensäure, Calendulasäure (8t10t12c-Octadecatriensäure), Catalpinsäure (9t11t13cOctadecatriensäure), Eleosterinsäure (9c11t13t-
25 Octadecatriensäure), Jacarinsäure (8c10t12c-Octadecatriensäure), Punicinsäure (9c11t13c-

- 17 -

Octadecatriensäure), Parinarinsäure (9c11t13t15c-Octadecatetraensäure), Pinolensäure (all-cis-5,9,12-Octadecatriensäure), Labaliensäure (5,6-Octadecadienallensäure), Ricinolsäure (12-Hydroxyölsäure) und/oder Coriolinsäure (13-Hydroxy-9c,11t-Octadecadienonsäure). Die vorgenannten Fettsäuren kommen in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureestern bzw. Fettsäuregemischen in der Regel vorteilhaft nur in Spuren vor, das heißt sie kommen bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 30 %, bevorzugt zu weniger als 25 %, 24 %, 23 %, 22 % oder 21 %, besonders bevorzugt zu weniger als 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % oder 5 %, ganz besonders bevorzugt zu weniger als 4 %, 3 %, 2 % oder 1 % vor. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kommen diese vorgenannten Fettsäuren bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 % oder 0,5 %, besonders bevorzugt zu weniger als 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 % vor. Vorteilhaft enthalten die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische weniger als 0,1 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren oder keine Buttersäure, kein Cholesterin, keine Clupanodonsäure (= Docosapentaensäure, C22:5 Δ 4,8,12,15,21) sowie keine Nisinsäure (Tetracosahexaensäure, C23:6 Δ 3,8,12,15,18,21).

Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bzw. im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen kann eine Steigerung der Ausbeute an mehrfach ungesättigten Fettsäuren von mindestens 50 %, vorteilhaft von mindestens 80 %, besonders vorteilhaft von mindestens 100 %, ganz besonders vorteilhaft von mindestens 150 % gegenüber dem nicht transgenen Ausgangsorganismus, beispielsweise einer Hefe, einer Alge, einem Pilz oder einer Pflanze wie Arabidopsis oder Lein beim Vergleich in der GC-Analyse erreicht werden.

Auch chemisch reine mehrfach ungesättigte Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind nach den vorbeschriebenen Verfahren darstellbar. Dazu werden die Fettsäuren oder die Fettsäure-

- 18 -

zusammensetzungen aus dem Organismus wie den Mikroorganismen oder den Pflanzen oder dem Kulturmedium, in dem oder auf dem die Organismen angezogen wurden, oder aus dem Organismus und dem Kulturmedium in bekannter Weise beispielsweise über Extraktion, Destillation, Kristallisation, Chromatographie oder Kombinationen dieser Methoden isoliert.

5 Diese chemisch reinen Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind für Anwendungen im Bereich der Lebensmittelindustrie, der Kosmetikindustrie und besonders der Pharmaindustrie vorteilhaft.

Als Organismus für die Herstellung im erfindungsgemäßen Verfahren kommen prinzipiell alle
10 Organismen wie Mikroorganismen, nicht-humane Tiere oder Pflanzen in Frage. Als Pflanzen kommen prinzipiell alle Pflanzen in Frage, die in der Lage sind Fettsäuren zu synthetisieren wie alle dicotylen oder monokotylen Pflanzen, Algen oder Moose.

Bei den Pflanzen handelt es sich vorteilhaft um Nutzpflanzen. Unter Nutzpflanzen sind Pflanzen
15 zu verstehen, die der Nahrungsproduktion für Mensch und Tier, der Produktion von Genussmitteln, Fasern und Pharmazeutika dienen wie Getreide z.B. Mais, Reis, Weizen, Gerste, Hirse, Hafer, Roggen, Buchweizen; wie Knollen z.B. Kartoffel, Maniok, Batate, Yams etc.; wie Zuckerpflanzen z.B. Zuckerrohr oder Zuckerrübe; wie Hülsenfrüchte z.B. Bohnen, Erbsen, Saubohne etc.; wie Öl- und Fettfrüchte z.B. Sojabohne, Raps, Sonnenblume, Färberdistel, Lein,
20 Camelina etc., um nur einige zu nennen. Vorteilhafte Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzenfamilien bestehend aus den Familien der Aceraceae, Actinidiaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Arecaceae, Asteraceae, Arecaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Cannabaceae, Cannaceae, Caprifoliaceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Dioscoreaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Fagaceae,
25 Geraniaceae, Gramineae, Grossulariaceae, Juglandaceae, Lauraceae, Leguminosae, Liliaceae,

- 19 -

Linaceae, Malvaceae, Moraceae, Musaceae, Oleaceae, Oxalidaceae, Papaveraceae, Poaceae, Polygonaceae, Prasinophyceae, Punicaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Sterculiaceae und Valerianaceae.

- 5 Beispielhaft seien die folgenden Pflanzen genannt ausgewählt aus der Gruppe: Adelotheceaceae wie die Gattungen *Physcomitrella* z.B. die Gattung und Arten *Physcomitrella patens*, Anacardiaceae wie die Gattungen *Pistacia*, *Mangifera*, *Anacardium* z.B. die Gattung und Arten *Pistacia vera* [Pistazie], *Mangifer indica* [Mango] oder *Anacardium occidentale* [Cashew], Asteraceae wie die Gattungen *Calendula*, *Carthamus*, *Centaurea*, *Cichorium*, *Cynara*, *Helianthus*,
 10 *Lactuca*, *Locusta*, *Tagetes*, *Valeriana* z.B. die Gattung und Arten *Calendula officinalis* [Garten-Ringelblume], *Carthamus tinctorius* [Färberdistel, safflower], *Centaurea cyanus* [Kornblume], *Cichorium intybus* [Wegwarte], *Cynara scolymus* [Artichoke], *Helianthus annuus* [Sonnenblume], *Lactuca sativa*, *Lactuca crispa*, *Lactuca esculenta*, *Lactuca scariola* L. ssp. *sativa*, *Lactuca scariola* L. var. *integrata*, *Lactuca scariola* L. var. *integrifolia*, *Lactuca sativa* subsp. *romana*,
 15 *Locusta communis*, *Valeriana locusta* [Salat], *Tagetes lucida*, *Tagetes erecta* oder *Tagetes tenuifolia* [Studentenblume], Apiaceae wie die Gattung *Daucus* z.B. die Gattung und Art *Daucus carota* [Karotte], Betulaceae wie die Gattung *Corylus* z.B. die Gattungen und Arten *Corylus avellana* oder *Corylus colurna* [Haselnuss], Boraginaceae wie die Gattung *Borago* z.B. die Gattung und Art *Borago officinalis* [Borretsch], Brassicaceae wie die Gattungen *Brassica*,
 20 *Camelina*, *Melanosinapis*, *Sinapis*, *Arabidopsis* z.B. die Gattungen und Arten *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [Raps], *Sinapis arvensis*, *Brassica juncea*, *Brassica juncea* var. *juncea*, *Brassica juncea* var. *crispifolia*, *Brassica juncea* var. *foliosa*, *Brassica nigra*, *Brassica sinapioides*, *Camelina sativa*, *Melanosinapis communis* [Senf], *Brassica oleracea* [Futterrübe] oder *Arabidopsis thaliana*, Bromeliaceae wie die Gattungen *Anana*, *Bromelia* (*Ananas*) z.B. die
 25 Gattungen und Arten *Anana comosus*, *Ananas ananas* oder *Bromelia comosa* [Ananas],

- 20 -

Caricaceae wie die Gattung *Carica* wie die Gattung und Art *Carica papaya* [Papaya],
Cannabaceae wie die Gattung *Cannabis* wie die Gattung und Art *Cannabis sativa* [Hanf],
Convolvulaceae wie die Gattungen *Ipomea*, *Convolvulus* z.B. die Gattungen und Arten *Ipomoea*
batatas, *Ipomoea pandurata*, *Convolvulus batatas*, *Convolvulus tiliaceus*, *Ipomoea fastigiata*,
5 *Ipomoea tiliacea*, *Ipomoea triloba* oder *Convolvulus panduratus* [Süßkartoffel, Batate],
Chenopodiaceae wie die Gattung *Beta* wie die Gattungen und Arten *Beta vulgaris*, *Beta vulgaris*
var. altissima, *Beta vulgaris var. vulgaris*, *Beta maritima*, *Beta vulgaris var. perennis*, *Beta*
vulgaris var. conditiva oder *Beta vulgaris var. esculenta* [Zuckerrübe], Cryptecodiniaceae wie
die Gattung *Cryptecodinium* z.B. die Gattung und Art *Cryptecodinium cohnii*, Cucurbitaceae
10 wie die Gattung *Cucurbita* z.B. die Gattungen und Arten *Cucurbita maxima*, *Cucurbita mixta*,
Cucurbita pepo oder *Cucurbita moschata* [Kürbis], Cymbellaceae wie die Gattungen *Amphora*,
Cymbella, *Okedenia*, *Phaeodactylum*, *Reimeria* z.B. die Gattung und Art *Phaeodactylum*
tricomutum, Ditrichaceae wie die Gattungen *Ditrichaceae*, *Astomiopsis*, *Ceratodon*,
Chrysoblastella, *Ditrichum*, *Distichium*, *Eccremidium*, *Lophidion*, *Philibertiella*, *Pleuridium*,
15 *Saelania*, *Trichodon*, *Skottsbergia* z.B. die Gattungen und Arten *Ceratodon antarcticus*,
Ceratodon columbiae, *Ceratodon heterophyllum*, *Ceratodon pu[phi]urascens*, *Ceratodon*
purpureus, *Ceratodon purpureus ssp. convolutus*, *Ceratodon purpureus ssp. stenocarpus*,
Ceratodon purpureus var. rotundifolius, *Ceratodon ratodon*, *Ceratodon stenocarpus*,
Chrysoblastella chilensis, *Ditrichum ambiguum*, *Ditrichum brevisetum*, *Ditrichum*
20 *crispatisimum*, *Ditrichum difficile*, *Ditrichum falcifolium*, *Ditrichum flexicaule*, *Ditrichum*
giganteum, *Ditrichum heteromallum*, *Ditrichum lineare*, *Ditrichum lineare*, *Ditrichum*
montanum, *Ditrichum montanum*, *Ditrichum pallidum*, *Ditrichum punctulatum*, *Ditrichum*
pusillum, *Ditrichum pusillum var. tortile*, *Ditrichum rhynchostegium*, *Ditrichum schimperii*,
Ditrichum tortile, *Distichium capillaceum*, *Distichium hagenii*, *Distichium inclinatum*,
25 *Distichium macounii*, *Eccremidium floridanum*, *Eccremidium whiteleggei*, *Lophidion strictus*,

Pleuridium acuminatum, Pleuridium alternifolium, Pleuridium holdridgei, Pleuridium mexicanum, Pleuridium ravenelii, Pleuridium subulatum, Saelania glaucescens, Trichodon borealis, Trichodon cylindricus oder Trichodon cylindricus var. oblongus, Elaeagnaceae wie die Gattung Elaeagnus z.B. die Gattung und Art Olea europaea [Olive], Ericaceae wie die Gattung
5 Kalmia z.B. die Gattungen und Arten Kalmia latifolia, Kalmia angustifolia, Kalmia microphylla, Kalmia polifolia, Kalmia occidentalis, Cistus chamaerhodendros oder Kalmia lucida [Berglorbeer], Euphorbiaceae wie die Gattungen Manihot, Janipha, Jatropha, Ricinus z.B. die Gattungen und Arten Manihot utilisissima, Janipha manihot,, Jatropha manihot, Manihot aipil, Manihot dulcis, Manihot manihot, Manihot melanobasis, Manihot esculenta [Manihot] oder
10 Ricinus communis [Rizinus], Fabaceae wie die Gattungen Pisum, Albizia, Cathormion, Feuillea, Inga, Pithecolobium, Acacia, Mimosa, Medicago, Glycine, Dolichos, Phaseolus, Soja z.B. die Gattungen und Arten Pisum sativum, Pisum arvense, Pisum humile [Erbsen], Albizia berteriana, Albizia julibrissin, Albizia lebbeck, Acacia berteriana, Acacia littoralis, Albizia berteriana, Albizzia berteriana, Cathormion berteriana, Feuillea berteriana, Inga fragrans, Pithecolobium
15 berterianum, Pithecolobium fragrans, Pithecolobium berterianum, Pseudalbizia berteriana, Acacia julibrissin, Acacia nemu, Albizia nemu, Feuillea julibrissin, Mimosa julibrissin, Mimosa speciosa, Sericanrda julibrissin, Acacia lebbeck, Acacia macrophylla, Albizia lebbeck, Feuillea lebbeck, Mimosa lebbeck, Mimosa speciosa [Seidenbaum], Medicago sativa, Medicago falcata, Medicago varia [Alfalfa] Glycine max Dolichos soja, Glycine gracilis, Glycine hispida,
20 Phaseolus max, Soja hispida oder Soja max [Sojabohne], Funariaceae wie die Gattungen Aphanorrhagma, Entosthodon, Funaria, Physcomitrella, Physcomitrium z.B. die Gattungen und Arten Aphanorrhagma serratum, Entosthodon attenuatus, Entosthodon bolanderi, Entosthodon bonplandii, Entosthodon californicus, Entosthodon drummondii, Entosthodon jamesonii, Entosthodon leibergii, Entosthodon neoscoticus, Entosthodon rubrissetus, Entosthodon
25 spathulifolius, Entosthodon tucsoni, Funaria americana, Funaria bolanderi, Funaria calcarea,

- 22 -

Funaria californica, Funaria calvescens, Funaria convoluta, Funaria flavicans, Funaria groutiana,
 Funaria hygrometrica, Funaria hygrometrica var. arctica, Funaria hygrometrica var. calvescens,
 Funaria hygrometrica var. convoluta, Funaria hygrometrica var. muralis, Funaria hygrometrica
 var. utahensis, Funaria microstoma, Funaria microstoma var. obtusifolia, Funaria muhlenbergii,
 5 Funaria orcuttii, Funaria piano-convexa, Funaria polaris, Funaria ravenelii, Funaria rubriseta,
 Funaria serrata, F[upsilon]naria sonora, Funaria sublimbatus, Funaria tucsoni, Physcomitrella
 californica, Physcomitrella patens, Physcomitrella readeri, Physcomitrium australe,
 Physcomitrium californicum, Physcomitrium collenchymatum, Physcomitrium coloradense,
 Physcomitrium cupuliferum, Physcomitrium drummondii, Physcomitrium eurystomum,
 10 Physcomitrium flexifolium, Physcomitrium hookeri, Physcomitrium hookeri var. serratum,
 Physcomitrium immersum, Physcomitrium kellermanii, Physcomitrium megalocarpum,
 Physcomitrium pyriforme, Physcomitrium pyriforme var. serratum, Physcomitrium rufipes,
 Physcomitrium sandbergii, Physcomitrium subsphaericum, Physcomitrium washingtoniense,
 Geraniaceae wie die Gattungen Pelargonium, Cocos, Oleum z.B. die Gattungen und Arten Cocos
 15 nucifera, Pelargonium grossularioides oder Oleum cocois [Kokusnuss], Gramineae wie die
 Gattung Saccharum z.B. die Gattung und Art Saccharum officinarum, Juglandaceae wie die
 Gattungen Juglans, Wallia z.B. die Gattungen und Arten Juglans regia, Juglans ailanthifolia,
 Juglans sieboldiana, Juglans cinerea, Wallia cinerea, Juglans bixbyi, Juglans californica, Juglans
 hindsii, Juglans intermedia, Juglans jamaicensis, Juglans major, Juglans microcarpa, Juglans
 20 nigra oder Wallia nigra [Walnuss], Lauraceae Wie die Gattungen Persea, Laurus z.B. die
 Gattungen und Arten Laurus nobilis [Lorbeer], Persea ame[eta]cana, Persea gratissima oder
 Persea persea [Avocado], Leguminosae wie die Gattung Arachis z.B. die Gattung und Art
 Arachis hypogaea [Erdnuss], Linaceae wie die Gattungen Linum, Adenolinum z.B. die Gattungen
 und Arten Linum usitatissimum, Linum humile, Linum aust[eta]acum, Linum bienne, Linum
 25 angustifolium, Linum catharticum, Linum flavum, Linum grandiflorum, Adenolinum

grandiflorum, *Linum lewisii*, *Linum narbonense*, *Linum perenne*, *Linum perenne* var. *lewisii*,
Linum pratense oder *Linum trigynum* [Lein], Lythrarieae wie die Gattung *Punica* z.B. die
Gattung und Art *Punica granatum* [Granatapfel], Malvaceae wie die Gattung *Gossypium* z.B. die
Gattungen und Arten *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium barbadense*,
5 *Gossypium herbaceum* oder *Gossypium thurberi* [Baumwolle], Marchantiaceae wie die Gattung
Marchantia z.B. die Gattungen und Arten *Marchantia berteroana*, *Marchantia foliacea*,
Marchantia macropora, Musaceae wie die Gattung *Musa* z.B. die Gattungen und Arten *Musa*
nana, *Musa acuminata*, *Musa paradisiaca*, *Musa* spp. [Banane], Onagraceae wie die Gattungen
Camissonia, *Oenothera* z.B. die Gattungen und Arten *Oenothera biennis* oder *Camissonia*
10 *brevipes* [Nachtkerze], Palmae wie die Gattung *Elaeis* z.B. die Gattung und Art *Elaeis guineensis*
[Ölpalme], Papaveraceae wie die Gattung *Papaver* z.B. die Gattungen und Arten *Papaver*
Orientalis, *Papaver rhoeas*, *Papaver dubium* [Mohn], Pedaliaceae wie die Gattung *Sesamum* z.B.
die Gattung und Art *Sesamum indicum* [Sesam], Piperaceae wie die Gattungen *Piper*, *Artanthe*,
Peperomia, *Steffensia* z.B. die Gattungen und Arten *Piper ad[upsilon]nucum*, *Piper amalago*, *Piper*
15 *angustifolium*, *Piper auritum*, *Piper betel*, *Piper cubeba*, *Piper longum*, *Piper nigrum*, *Piper*
retrofractum, *Artanthe adunca*, *Artanthe elongata*, *Peperomia elongata*, *Piper elongatum*,
Steffensia elongata [Cayennepfeffer], Poaceae wie die Gattungen *Hordeum*, *Secale*, *Avena*,
Sorghum, *Andropogon*, *Holcus*, *Panicum*, *Oryza*, *Zea* (Mais), *Triticum* z.B. die Gattungen und
Arten *Hordeum vulgare*, *Hordeum jubatum*, *Hordeum murinum*, *Hordeum secalinum*, *Hordeum*
20 *distichon* *Hordeum aegiceras*, *Hordeum hexastichon*, *Hordeum hexastichum*, *Hordeum*
irregulare, *Hordeum sativum*, *Hordeum secalinum* [Gerste], *Secale cereale* [Roggen], *Avena*
sativa, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida* [Hafer], *Sorghum*
bicolor, *Sorghum halepense*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum vulgare*, *Andropogon drummondii*,
Holcus bicolor, *Holcus sorghum*, *Sorghum aethiopicum*, *Sorghum arundinaceum*, *Sorghum*
25 *caffroorum*, *Sorghum cernuum*, *Sorghum dochna*, *Sorghum drummondii*, *Sorghum durra*,

- 24 -

Sorghum guineense, Sorghum lanceolatum, Sorghum nervosum, Sorghum saccharatum, Sorghum subglabrescens, Sorghum verticilliflorum, Sorghum vulgare, Holcus halepensis, Sorghum miliaceum, Panicum militaceum [Hirse], Oryza sativa, Oryza latifolia [Reis], Zea mays [Mais] Triticum aestivum, Triticum durum, Triticum turgidum, Triticum hybernum, Triticum macha,
5 Triticum sativum oder Triticum vulgare [Weizen], Porphyridiaceae wie die Gattungen Chroothece, Flintiella, Petrovanella, Porphyridium, Rhodella, Rhodosorus, Vanhoeffenia z.B. die Gattung und Art Porphyridium cr[upsilon]entum, Proteaceae wie die Gattung Macadamia z.B. die Gattung und Art Macadamia intergrifolia [Macadamia], Prasinophyceae wie die Gattungen Nephroselmis, Prasinococcus, Scherffelia, Tetraselmis, Mantoniella, Ostreococcus z.B. die
10 Gattungen und Arten Nephroselmis olivacea, Prasinococcus capsulatus, Scherffelia dubia, Tetraselmis chui, Tetraselmis suecica, Mantoniella squamata, Ostreococcus tauri, Rubiaceae wie die Gattung Coffea z.B. die Gattungen und Arten Coffea spp., Coffea arabica, Coffea canephora oder Coffea liberica [Kaffee], Scrophulariaceae wie die Gattung Verbascum z.B. die Gattungen und Arten Verbascum blattaria, Verbascum chaixii, Verbascum densiflorum, Verbascum lagurus,
15 Verbascum longifolium, Verbascum lychnitis, Verbascum nigrum, Verbascum olympicum, Verbascum phlomoides, Verbascum phoenicum, Verbascum pulverulentum oder Verbascum thapsus [Königskerze], Solanaceae wie die Gattungen Capsicum, Nicotiana, Solanum, Lycopersicon z.B. die Gattungen und Arten Capsicum annuum, Capsicum annuum var. glabriusculum, Capsicum frutescens [Pfeffer], Capsicum annuum [Paprika], Nicotiana tabacum,
20 Nicotiana alata, Nicotiana attenuata, Nicotiana glauca, Nicotiana langsdorffii, Nicotiana obtusifolia, Nicotiana quadrivalvis, Nicotiana repanda, Nicotiana rustica, Nicotiana sylvestris [Tabak], Solanum tuberosum [Kartoffel], Solanum melongena [Aubergine], Lycopersicon esculentum, Lycopersicon lycopersicum, Lycopersicon py[eta]forme, Solanum integrifolium oder Solanum lycopersicum [Tomate], Sterculiaceae wie die Gattung Theobroma z.B. die Gattung und
25 Art Theobroma cacao [Kakao] oder Theaceae wie die Gattung Camellia z.B. die Gattung und Art

Camellia sinensis [Tee].

Vorteilhafte Mikroorganismen sind beispielsweise Pilze ausgewählt aus der Gruppe der Familien Chaetomiaceae, Choanephoraceae, Cryptococcaceae, Cunninghamellaceae, Dematiaceae, 5 Moniliaceae, Mortierellaceae, Mucoraceae, Pythiaceae, Saccharomycetaceae, Saprolegniaceae, Schizosacharomycetaceae, Sodariaceae oder Tuberculariaceae. Beispielhaft seien die folgenden Mikroorganismen genannt ausgewählt aus der Gruppe: Choanephoraceae wie den Gattungen Blakeslea, Choanephora z.B. die Gattungen und Arten Blakeslea trispora, Choanephora cueurbitarum, Choanephora infundibulifera var. cueurbitarum, Mortierellaceae wie der Gattung 10 Mortierella z.B. die Gattungen und Arten Mortierella isabellina, Mortierella polycephala, Mortierella ramanniana, Mortierella vinacea, Mortierella zonata, Pythiaceae wie den Gattungen Phytium, Phytophthora z.B. die Gattungen und Arten Pythium debaryanum, Pythium intermedium, Pythium irregulare, Pythium megalacanthum, Pythium paroecandrum, Pythium sylvaticum, Pythium ultimum, Phytophthora cactorum, Phytophthora cinnamomi, Phytophthora 15 citricola, Phytophthora citrophthora, Phytophthora cryptogea, Phytophthora drechsleri, Phytophthora erythroseptica, Phytophthora lateralis, Phytophthora megasperma, Phytophthora nicotianae, Phytophthora nicotianae var. parasitica, Phytophthora palmivora, Phytophthora parasitica, Phytophthora syringae, Saccharomycetaceae wie den Gattungen Hansenula, Pichia, Saccharomyces, Saccharomycodes, Yarrowia z.B. die Gattungen und Arten Hansenula anomala, 20 Hansenula californica, Hansenula canadensis, Hansenula capsulata, Hansenula ciferrii, Hansenula glucozyma, Hansenula henricii, Hansenula holstii, Hansenula minuta, Hansenula nonfermentans, Hansenula philodendri, Hansenula polymorphe, Hansenula saturnus, Hansenula subpelliculosa, Hansenula wickerhamii, Hansenula wingei, Pichia alcoholophila, Pichia angusta, Pichia anomala, Pichia bispora, Pichia burtonii, Pichia canadensis, Pichia capsulata, Pichia carsonii, Pichia 25 cellobiosa, Pichia ciferrii, Pichia farinosa, Pichia fermentans, Pichia finlandica, Pichia

- 26 -

glucozyma, *Pichia guilliermondii*, *Pichia haplophila*, *Pichia henricii*, *Pichia holstii*, *Pichia jadinii*,
Pichia lindnerii, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia methanolica*, *Pichia minuta* var. *minuta*, *Pichia*
minuta var. *nonfermentans*, *Pichia norvegensis*, *Pichia ohmeri*, *Pichia pastoris*, *Pichia*
5 *philodendri*, *Pichia pini*, *Pichia polymorphe*, *Pichia quercuum*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia*
sargentensis, *Pichia stipitis*, *Pichia strasburgensis*, *Pichia subpelliculosa*, *Pichia toletana*, *Pichia*
trehalophila, *Pichia vini*, *Pichia xylosa*, *Saccharomyces acetii*, *Saccharomyces bailii*,
Saccharomyces bayanus, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomyces capensis*, *Saccharomyces*
carlsbergensis, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*,
Saccharomyces chevalieri, *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces diastaticus*,
10 *Saccharomyces drosophilae*, *Saccharomyces elegans*, *Saccharomyces ellipsoideus*,
Saccharomyces fermentati, *Saccharomyces florentinus*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces*
heterogenicus, *Saccharomyces hienipiensis*, *Saccharomyces inusitatus*, *Saccharomyces italicus*,
Saccharomyces kluyveri, *Saccharomyces krusei*, *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces*
marxianus, *Saccharomyces microellipsoides*, *Saccharomyces montanus*, *Saccharomyces*
15 *norbensis*, *Saccharomyces oleaceus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*,
Saccharomyces pretoriensis, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces*
uvarum, *Saccharomycodes ludwigii*, *Yarrowia lipolytica*, Schizosaccharomycetaceae such as the
genera *Schizosaccharomyces* e.g. the species *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*,
Schizosaccharomyces japonicus var. *versatilis*, *Schizosaccharomyces malidevorans*,
20 *Schizosaccharomyces octosporus*, *Schizosaccharomyces pombe* var. *malidevorans*,
Schizosaccharomyces pombe var. *pombe*, Thraustochytriaceae such as the genera *Althomia*,
Aplanochytrium, *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* e.g. the species
Schizochytrium aggregatum, *Schizochytrium limacinum*, *Schizochytrium mangrovei*,
Schizochytrium minutum, *Schizochytrium octosporum*, *Thraustochytrium aggregatum*,
25 *Thraustochytrium amoeboides*, *Thraustochytrium antacticum*, *Thraustochytrium arudimentale*,

- 27 -

Thraustochytrium aureum, Thraustochytrium benthicola, Thraustochytrium globosum, Thraustochytrium indicum, Thraustochytrium kerguelense, Thraustochytrium kinnei, Thraustochytrium motivum, Thraustochytrium multirudimentale, Thraustochytrium pachydermum, Thraustochytrium proliferum, Thraustochytrium roseum, Thraustochytrium rossii, 5 Thraustochytrium striatum oder Thraustochytrium visurgense. Weitere vorteilhafte Mikroorganismen sind beispielweise Bakterien ausgewählt aus der Gruppe der Familien Bacillaceae, Enterobacteriaceae oder Rhizobiaceae.

Beispielhaft seien die folgenden Mikroorganismen genannt ausgewählt aus der Gruppe:

10 Bacillaceae wie die Gattung Bacillus z.B die Gattungen und Arten Bacillus acidocaldarius, Bacillus acidoterrestris, Bacillus alcalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus amylolyticus, Bacillus brevis, Bacillus cereus, Bacillus circulans, Bacillus coagulans, Bacillus sphaericus subsp. fusiformis, Bacillus galactophilus, Bacillus globisporus, Bacillus globisporus subsp. marinus, Bacillus halophilus, Bacillus lentimorbus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, 15 Bacillus megaterium, Bacillus polymyxa, Bacillus psychrosaccharolyticus, Bacillus pumilus, Bacillus sphaericus, Bacillus subtilis subsp. spizizenii, Bacillus subtilis subsp. subtilis oder Bacillus thuringiensis; Enterobacteriaceae wie die Gattungen Citrobacter, Edwardsiella, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Klebsiella, Salmonella oder Serratia z.B die Gattungen und Arten Citrobacter amalonaticus, Citrobacter diversus, Citrobacter freundii, Citrobacter 20 genomospecies, Citrobacter gillenbergii, Citrobacter intermedium, Citrobacter koseri, Citrobacter murliniae, Citrobacter sp., Edwardsiella hoshinae, Edwardsiella ictaluri, Edwardsiella tarda, Erwinia alni, Erwinia amylovora, Erwinia ananatis, Erwinia aphidicola, Erwinia billingiae, Erwinia cacticida, Erwinia cancerogena, Erwinia carnegiana, Erwinia carotovora subsp. atroseptica, Erwinia carotovora subsp. betavascularum, Erwinia carotovora subsp. odorifera, 25 Erwinia carotovora subsp. wasabiae, Erwinia chrysanthemi, Erwinia cypripedii, Erwinia

- 28 -

dissolvens, *Erwinia herbicola*, *Erwinia mallotivora*, *Erwinia milletiae*, *Erwinia nigrifluens*,
Erwinia nimipressuralis, *Erwinia persicina*, *Erwinia psidii*, *Erwinia pyrifoliae*, *Erwinia quercina*,
Erwinia rhapontici, *Erwinia rubrifaciens*, *Erwinia Salicis*, *Erwinia stewartii*, *Erwinia tracheiphila*,
Erwinia uredovora, *Escherichia adecarboxylata*, *Escherichia anindolica*, *Escherichia aurescens*,
5 *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* var. *communior*, *Escherichia coli*-mutabile,
Escherichia fergusonii, *Escherichia hermannii*, *Escherichia sp.*, *Escherichia vulneris*, *Klebsiella*
aerogenes, *Klebsiella edwardsii* subsp. *atlantae*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*,
Klebsiella planticola, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*,
Klebsiella sp., *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella trevisanii*, *Salmonella abony*, *Salmonella arizonae*,
10 *Salmonella bongori*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp.
bongori, *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *diarizonae*,
Salmonella choleraesuis subsp. *houtenae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *indica*, *Salmonella*
choleraesuis subsp. *salamae*, *Salmonella daressalaam*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*,
Salmonella enterica subsp. *salamae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella*
15 *heidelberg*, *Salmonella panama*, *Salmonella senftenberg*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*
entomophila, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia grimesii*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia*
marcescens, *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*, *Serratia marinorubra*, *Serratia odorifera*,
Serratia plymouthensis, *Serratia plymuthica*, *Serratia proteamaculans*, *Serratia proteamaculans*
subsp. *quinovora*, *Serratia quinivorans* oder *Serratia rubidaea*; Rhizobiaceae wie die Gattungen
20 *Agrobacterium*, *Carbophilus*, *Chelatobacter*, *Ensifer*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* z.B. die
Gattungen und Arten *Agrobacterium atlanticum*, *Agrobacterium ferrugineum*, *Agrobacterium*
gelatinovororum, *Agrobacterium larrymoorei*, *Agrobacterium meteorii*, *Agrobacterium radiobacter*,
Agrobacterium rhizogenes, *Agrobacterium rubi*, *Agrobacterium stellulatum*, *Agrobacterium*
tumefaciens, *Agrobacterium vitis*, *Carbophilus carboxidus*, *Chelatobacter heintzii*, *Ensifer*
25 *adhaerens*, *Ensifer arboris*, *Ensifer fredii*, *Ensifer kostiensis*, *Ensifer kummerowiae*, *Ensifer*

- 29 -

medicae, *Ensifer meliloti*, *Ensifer sahari*, *Ensifer teranga*, *Ensifer xinjiangensis*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium fredii*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium hainanense*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium huautlense*, *Rhizobium indigoferae*, *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium loessense*,
5 *Rhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, *Rhizobium mediterraneum*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium mongolense*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium sullae*, *Rhizobium tianshanense*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium undicola*, *Rhizobium vitis*, *Sinorhizobium adhaerens*, *Sinorhizobium arboris*, *Sinorhizobium fredii*, *Sinorhizobium kostiense*, *Sinorhizobium kummerowiae*, *Sinorhizobium medicae*, *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium morelense*, *Sinorhizobium sahari* oder
10 *Sinorhizobium xinjiangense*.

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

Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren transgene Organismen wie Pilze wie
20 *Mortierella* oder *Traustochytrium*, Hefen wie *Saccharomyces* oder *Schizosaccharomyces*, Moose wie *Physcomitrella* oder *Ceratodon*, nicht-humane Tiere wie *Caenorhabditis*, Algen wie *Nephroselmis*, *Pseudoscurfieldia*, *Prasinococcus*, *Scherffelia*, *Tetraselmis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Cryptocodium* oder *Phaeodactylum* oder Pflanzen wie zweikeimblättrige oder einkeimblättrige Pflanzen verwendet. Besonders vorteilhaft werden Organismen im erfindungs-
25 gemäßen Verfahren verwendet, die zu den Öl-produzierenden Organismen gehören, das heißt die

- 30 -

für die Herstellung von Ölen verwendet werden, wie Pilze wie *Mortierella* oder *Thraustochytrium*, Algen wie *Nephroselmis*, *Pseudoscourfieldia*, *Prasinococcus*, *Scherffelia*, *Tetraselmis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Cryptothecodinium*, *Phaeodactylum* oder Pflanzen, insbesondere Pflanzen, bevorzugt Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie

5 Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Saflor (*Carthamus tinctoria*), Mohn, Senf, Hanf, Rizinus, Olive, Sesam, Calendula, Punica, Nachtkerze, Königskerze, Distel, Wildrosen, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss oder Walnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie

10 Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Saflor, Mohn, Senf, Hanf, Rhizinus, Olive, Calendula, Punica, Nachtkerze, Kürbis, Lein, Soja, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss). Besonders bevorzugt sind C 18:2- und/oder C18:3-

15 Fettsäure-reiche Pflanzen wie Sonnenblume, Färberdistel, Tabak, Königskerze, Sesam, Baumwolle, Kürbis, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Lein, Hanf, Distel oder Färberdistel. Ganz besonders bevorzugt sind Pflanzen wie Färberdistel, Sonnenblume, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Lein oder Hanf.

20 Für das erfindungsgemäße beschriebene Verfahren ist es vorteilhaft in die Pflanzen zusätzlich zu den unter Verfahrensschritt (a) und (b) eingebrachten Nukleinsäuren sowie den ggf. eingebrachten Nukleinsäuresequenzen, die für die Δ -6-Elongase und/oder die ω -3-Desaturasen kodieren, zusätzlich weitere Nukleinsäuren einzubringen, die für Enzyme des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels kodieren.

25

Im Prinzip können alle Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels vorteilhaft in Kombination mit den im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für die Δ -6-Desaturase(n), Δ -5-Desaturase(n), Δ -6-Elongase(n) und/oder ω -3-Desaturase(n) [im Sinne dieser Anmeldung soll der Plural den Singular und umgekehrt beinhalten] kodieren, verwendet werden; vorteilhaft werden Gene des Fettsäure oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) in Kombination mit der Δ -6-Elongase, Δ -6-Desaturase, Δ -5-Desaturase und/oder ω -3-Desaturase verwendet. Besonders bevorzugt werden Gene ausgewählt aus der Gruppe der Δ -4-Desaturasen, Δ -8-Desaturasen, Δ -9-Desaturasen, Δ -12-Desaturasen, Δ -5-Elongasen oder Δ -9-Elongasen in Kombination mit den vorgenannten Genen für die Δ -6-Elongase, Δ -6-Desaturase, Δ -5-Desaturase und/oder ω -3-Desaturase verwendet, wobei einzelne Gene oder mehrere Gene in Kombination verwendet werden können.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete ω -3-Desaturase sollte vorteilhaft eine Verschiebung vom ω -6-Biosyntheseweg zum ω -3-Biosyntheseweg ermöglichen, was vorteilhaft zu einer Verschiebung von C18:2- zu C18:3-Fettsäuren führt. Durch diese Eigenschaften der ω -3-Desaturase ist es vorteilhaft möglich, das Fettsäurespektrum innerhalb eines Organismus, vorteilhaft innerhalb einer Pflanze oder einem Pilz von den ω -6-Fettsäuren zu den ω -3-Fettsäuren hin zu verschieben. Weiterhin ist vorteilhaft, dass die ω -3-Desaturase eine breite Palette von Phospholipiden wie Phosphatidylcholin (= PC), Phosphatidylinositol (= PIS) oder Phosphatidylethanolamin (= PE) umsetzt. Schließlich lassen sich auch Desaturierungsprodukte in den

- 32 -

Neutrallipiden (= NL), das heißt in den Triglyceriden finden.

Die erfindungsgemäßen $\Delta 5$ -Desaturasen und $\Delta 6$ -Desaturasen aus *Mantoniella squamata* haben gegenüber den bekannten $\Delta 5$ -Desaturasen und $\Delta 6$ -Desaturasen, beispielweise aus *Phaeodactylum*
5 *tricornutum*, den Vorteil, dass sie Fettsäuren gebunden an Phospholipide oder CoA-Fettsäureester, vorteilhaft CoA-Fettsäureester umsetzen können. Vorteilhaft setzen die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Desaturasen ihre jeweiligen Substrate in Form der CoA-Fettsäureester um (siehe Beispiele 10 und 11). Dies führt, wenn vorher ein Elongationsschritt stattgefunden hat, vorteilhaft zu einer erhöhten Produktausbeute. Die
10 jeweiligen Desaturierungsprodukte werden dadurch in höheren Mengen synthetisiert, da der Elongationsschritt in der Regel an den CoA-Fettsäureestern erfolgt, während der Desaturierungsschritt überwiegend an den Phospholipiden oder an den Triglyceriden erfolgt. Eine Austauschreaktion zwischen den CoA-Fettsäureestern und den Phospholipiden oder Triglyceriden, die eine weitere möglicherweise limitierende Enzymreaktion erforderlich machen
15 würde, ist somit nicht erforderlich.

Durch die enzymatische Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit $\Delta 6$ -Elongase-, $\Delta 6$ -Desaturase-, $\Delta 5$ -Desaturase- und/oder $\omega 3$ -Desaturaseaktivität kodieren, vorteilhaft in Kombination mit Nukleinsäuresequenzen, die für
20 Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie weiteren Polypeptiden mit $\Delta 4$ -, $\Delta 5$ -, $\Delta 6$ -, $\Delta 8$ -, $\Delta 12$ -Desaturase oder $\Delta 5$ -, $\Delta 6$ - oder $\Delta 9$ -Elongaseaktivität kodieren, können unterschiedlichste mehrfach ungesättigte Fettsäuren im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt werden. Je nach Auswahl der für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Nutzpflanzen lassen sich Mischungen der verschiedenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder einzelne
25 mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie EPA oder ARA in freier oder gebundener Form herstellen.

- 33 -

Je nachdem welche Fettsäurezusammensetzung in der Ausgangspflanze vorherrscht (C18:2- oder C18:3-Fettsäuren) entstehen so Fettsäuren, die sich von C18:2- Fettsäuren ableiten, wie GLA, DGLA oder ARA oder solche, die sich von C18:3-Fettsäuren ableiten, wie SDA, ETA oder EPA. Liegt in der für das Verfahren verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur Linolsäure (= LA, C18:2^{Δ9,12}) vor, so können als Produkte des Verfahrens nur GLA, DGLA und ARA
5 entstehen, die als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen können. Ist in der im Verfahren verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur α-Linolensäure (= ALA, C18:3^{Δ9,12,15}) vorhanden, beispielsweise wie in Lein, so können als Produkte des Verfahrens nur SDA, ETA und/oder EPA entstehen, die wie oben beschrieben als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen
10 können. Durch Modifikation der Aktivität der im Verfahren verwendeten und an der Synthese beteiligten Enzyme Δ-6-Elongase, Δ-6-Desaturase, Δ-5-Desaturase und/oder ω-3-Desaturase vorteilhaft in Kombination mit weiteren Genen des Lipid- oder Fettsäurestoffwechsels lassen sich gezielt in den Pflanzen nur einzelne Produkte herstellen. Vorteilhaft werden nur ARA oder EPA oder deren Mischungen synthetisiert, abhängig von der in dem Organismus bzw. in der Pflanze
15 vorliegenden Fettsäure, die als Ausgangssubstanz für die Synthese dient. Da es sich um Biosyntheseketten handelt, liegen die jeweiligen Endprodukte nicht als Reinsubstanzen in den Organismen vor. Es sind immer auch geringe Mengen der Vorläuferverbindungen im Endprodukt enthalten. Diese geringen Mengen betragen weniger als 20 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 15 Gew.-%, besonders vorteilhaft weniger als 10 Gew.-%, ganz besonders vorteilhaft weniger als 5,
20 4, 3, 2 oder 1 Gew.-% bezogen auf das Endprodukt EPA oder ARA oder deren Mischungen.

Neben der Produktion der Ausgangsfettsäuren für das erfindungsgemäße Verfahren direkt in dem Organismus, speziell der Pflanze, können die Fettsäuren prinzipiell auch von außen gefüttert werden. Aus Kostengründen ist die Produktion im Organismus, speziell in der Pflanze,
25 bevorzugt. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure (C18:2^{Δ9,12}), γ-Linolensäure (C18:3^{Δ6,9,12}),

- 34 -

Eicosadiensäure (C20:2 Δ 11,14), Dihomo- γ -linolensäure (C20:3 Δ 8,11,14), Arachidonsäure (C20:4 Δ 5,8,11,14), Docosatetraensäure (C22:4 Δ 7,10,13,16) und Docosapentaensäure (C22:5 Δ 4,7,10,13,15).

- 5 Zur Steigerung der Ausbeute im beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem vorteilhaft erhöhten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist es vorteilhaft die Menge an Ausgangsprodukt für die Fettsäuresynthese zu steigern, dies kann beispielsweise durch das Einbringen einer Nukleinsäure in den Organismus, die für ein Poly-
- 10 peptid mit Δ -12-Desaturase-Aktivität kodiert, erreicht werden. Dies ist besonders vorteilhaft bei Öl-produzierenden Organismen wie der Familie der Brassicaceae wie der Gattung Brassica z.B. Raps; der Familie der Elaeagnaceae wie die Gattung Elaeagnus z.B. die Gattung und Art Olea europaea oder der Familie Fabaceae wie der Gattung Glycine z.B. die Gattung und Art Glycine max, die einen hohen Ölsäuregehalt aufweisen. Da diese Organismen nur einen geringen Gehalt an Linolsäure aufweisen, ist die Verwendung der genannten Δ -12-Desaturasen zur Herstellung
- 15 des Ausgangsprodukts Linolsäure vorteilhaft.

- Im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Nukleinsäuren stammen vorteilhaft aus Pflanzen wie Algen beispielsweise Algen der Familie der Prasinophyceae wie aus den Gattungen Heteromastix, Mammella, Mantoniella, Micromonas, Nephroselmis, Ostreococcus,
- 20 Prasinocladus, Prasinococcus, Pseudoscourfielda, Pycnococcus, Pyramimonas, Scherffelia oder Tetraselmis wie den Gattungen und Arten Heteromastix longifillis, Mamiella gilva, Mantoniella squamata, Micromonas pusilla, Nephroselmis olivacea, Nephroselmis pyriformis, Nephroselmis rotunda, Ostreococcus tauri, Ostreococcus sp. Prasinocladus ascus, Prasinocladus lubricus, Pycnococcus provasolii, Pyramimonas amyliifera, Pyramimonas disomata, Pyramimonas obovata,
- 25 Pyramimonas orientalis, Pyramimonas parkeae, Pyramimonas spinifera, Pyramimonas sp.,

- 35 -

Tetraselmis apiculata, Tetraselmis carteriaformis, Tetraselmis chui, Tetraselmis convolutae, Tetraselmis desikacharyi, Tetraselmis gracilis, Tetraselmis hazeni, Tetraselmis impellucida, Tetraselmis inconspicua, Tetraselmis levis, Tetraselmis maculata, Tetraselmis marina, Tetraselmis striata, Tetraselmis subcordiformis, Tetraselmis suecica, Tetraselmis tetrabrachia, 5 Tetraselmis tetrathele, Tetraselmis verrucosa, Tetraselmis verrucosa fo. rubens oder Tetraselmis sp. oder aus Algen der Familie Euglenaceae wie aus den Gattungen Ascoglena, Astasia, Colacium, Cyclidiopsis, Euglena, Euglenopsis, Hyalophacus, Khawkinea, Lepocinclis, Phacus, Strombomonas oder Trachelomonas wie die Gattungen und Art Euglena acus, Euglena geniculata, Euglena gracilis, Euglena mixocylindracea, Euglena rostrifera, Euglena viridis, 10 Colacium stentorium, Trachelomonas cylindrica oder Trachelomonas volvocina. Vorteilhaft stammen die verwendeten Nukleinsäuren aus Algen der Gattungen Euglena, Mantoniella oder Ostreococcus.

Weitere vorteilhafte Pflanzen sind Algen wie Isochrysis oder Crypthecodinium, Algen/ 15 Diatomeen wie Thalassiosira oder Phaeodactylum, Moose wie Physcomitrella oder Ceratodon oder höhere Pflanzen wie Primulaceae wie Aleuritia, Calendula stellata, Osteospermum spinescens oder Osteospermum hyoseroides, Mikroorganismen wie Pilzen wie Aspergillus, Thraustochytrium, Phytophthora, Entomophthora, Mucor oder Mortierella, Bakterien wie Shewanella, Hefe oder Tiere wie Nematoden wie Caenorhabditis, Insekten, Fröschen, Seegurken 20 oder Fischen. Bevorzugt stammen die Nukleinsäuresequenzen aus der Klasse der Vertebrata; Euteleostomi, Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes; Salmonidae bzw. Oncorhynchus oder Vertebrata, Amphibia, Anura, Pipidae, Xenopus oder Evertebrata wie Protochordata, Tunicata, Holothuroidea, Cionidae wie Amaroucium constellatum, Botryllus schlössen, Ciona intestinalis, Molgula citrina, Molgula 25 manhattensis, Perophora viridis oder Styela partita. Besonders vorteilhaft stammen die

- 36 -

Nukleinsäuren aus Pilzen, Tieren oder aus Pflanzen wie Algen oder Moosen, bevorzugt aus der Ordnung der Salmoniformes wie der Familie der Salmonidae wie der Gattung *Salmo* beispielsweise aus den Gattungen und Arten *Oncorhynchus mykiss*, *Trutta trutta* oder *Salmo trutta fario*, aus Algen wie den Gattungen *Mantoniella* oder *Ostreococcus* oder aus den
5 Diatomeen wie den Gattungen *Thalassiosira* oder *Phaeodactylum* oder aus Algen wie *Cryptocodinium*.

Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen oder deren Derivate oder Homologe, die für Polypeptide kodieren, die noch die enzymatische
10 Aktivität der durch die Nukleinsäuresequenzen kodierten Proteine besitzen, in dem Organismus exprimiert. Diese Sequenzen werden einzeln oder in Kombination mit den für die Δ -12-Desaturase, Δ -4-Desaturase, Δ -5-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -5-Elongase, Δ -6-Elongase und/oder ω -3-Desaturase kodierenden Nukleinsäuresequenzen in Expressionskonstrukte kloniert und zum Einbringen und zur Expression in Organismen verwendet. Diese Expressionskonstrukte
15 ermöglichen durch ihre Konstruktion eine vorteilhafte optimale Synthese der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens einer Zelle oder eines ganzen Organismus, speziell einer ganzen Pflanze, der die im Verfahren
20 verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für eine Δ -6-Desaturase, Δ -6-Elongase, Δ -5-Desaturase und/oder ω -3-Desaturase kodieren, enthält, wobei die Zelle und/oder der Organismus noch weitere Nukleinsäuresequenzen des Lipid- oder Fettsäurestoffwechsels enthalten kann. Diese im Verfahren bevorzugt verwendeten Nukleinsäuresequenzen werden zur Expression vorteilhaft in mindestens ein Genkonstrukt und/oder einen Vektor wie nachfolgend beschrieben, allein oder in
25 Kombination mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine des Fettsäure- oder Lipid-

- 37 -

stoffwechsels kodieren, eingebaut und schließlich in die Zelle oder den Organismus transformiert. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens der Öle, Lipide oder freien Fettsäuren aus dem Organismus oder aus der Kultur. Bei der Kultur kann es sich beispielsweise um eine Fermentationskultur beispielsweise im Falle der Kultivierung von Mikroorganismen wie z.B. Mortierella, Thalassiosira, Mantoniella, Ostreococcus, Saccharomyces oder Thraustochytrium oder um eine Treibhaus- oder Feldkultur einer Pflanze handeln. Die so hergestellte Zelle oder der so hergestellte Organismus ist vorteilhaft eine Zelle eines Öl-produzierenden Organismus wie einer Ölfruchtpflanze wie beispielsweise Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Erdnuss, Soja, Safflower, Hanf, Sonnenblumen oder Borretsch.

Unter Anzucht ist beispielsweise die Kultivierung im Falle von Pflanzenzellen, -gewebe oder -organen auf oder in einem Nährmedium oder der ganzen Pflanze auf bzw. in einem Substrat beispielsweise in Hydrokultur, Blumentopferde oder auf einem Ackerboden zu verstehen.

"Transgen" bzw. "Rekombinant" im Sinne der Erfindung bedeutet bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette (= Genkonstrukt) oder einem Vektor enthaltend die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustande gekommenen Konstruktionen, in denen sich entweder a) die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, oder b) eine mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder c) (a) und (b) sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielsweise eine Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertion eines oder mehrerer Nukleotidreste sein

- 38 -

kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen genomischen bzw. chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz
5 zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp.

Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des natürlichen Promotors der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten
10 Nukleinsäuresequenz, die für Proteine mit entsprechender Δ -6-Desaturase-, Δ -6-Elongase-, Δ -5-Desaturase- und/oder ω -3-Desaturaseaktivität kodiert, vorteilhaft in Kombination mit Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit Δ -12-Desaturase-, Δ -4-Desaturase-, Δ -8-Desaturase-, Δ -9-Elongase-, und/oder Δ -5-Elongaseaktivität kodieren, wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie
15 beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beispielsweise beschrieben in US 5,565,350 oder WO 00/15815.

Unter transgenem Organismus bzw. transgener Pflanze im Sinne der Erfindung ist wie vorgenannt zu verstehen, dass die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren nicht an ihrer
20 natürlichen Stelle im Genom eines Organismus sind, dabei können die Nukleinsäuren homolog oder heterolog exprimiert werden. Transgen bedeutet aber auch wie genannt, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an ihrem natürlichen Platz im Genom eines Organismus sind, dass jedoch die Sequenz gegenüber der natürlichen Sequenz verändert wurde und/oder dass die Regulationssequenzen, der natürlichen Sequenzen verändert wurden. Bevorzugt ist unter transgen
25 die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an nicht-natürlicher Stelle im Genom zu

- 39 -

verstehen, das heißt eine homologe oder bevorzugt heterologe Expression der Nukleinsäuren liegt vor. Bevorzugte transgene Organismen sind Pilze wie *Mortierella* oder *Phytophthora*, Moose wie *Physcomitrella*, Algen wie *Mantoniella* oder *Ostreococcus*, Diatomeen wie *Thalassiosira* oder *Cryptocodinium* oder Pflanzen wie die Ölfruchtpflanzen und Öl-produzierende Pflanzen, Gemüse-, Salat- oder Zierpflanzen, die vorteilhaft ausgewählt sind aus der Gruppe der Pflanzenfamilien bestehend aus den Familien der *Aceraceae*, *Actinidiaceae*, *Anacardiaceae*, *Apiaceae*, *Arecaceae*, *Asteraceae*, *Arecaceae*, *Betulaceae*, *Boraginaceae*, *Brassicaceae*, *Bromeliaceae*, *Cannabaceae*, *Cannaceae*, *Caprifoliaceae*, *Chenopodiaceae*, *Convolvulaceae*, *Cucurbitaceae*, *Dioscoreaceae*, *Elaeagnaceae*, *Ericaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Fagaceae*, *Grossulaceae*, *Juglandaceae*, *Lauraceae*, *Liliaceae*, *Linaceae*, *Malvaceae*, *Moraceae*, *Musaceae*, *Oleaceae*, *Oxalidaceae*, *Papaveraceae*, *Poaceae*, *Polygonaceae*, *Punicaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, *Sterculiaceae* und *Valerianaceae*.

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

- 40 -

Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum*, *Phytophthora infestans* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersaflor, Flachs, Hanf, Rizinus, Calendula, Erdnuss, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Flachs, Raps, 5 Färbersaflor, Sonnenblume, Calendula, *Mortierella* oder *Saccharomyces cerevisiae*. Prinzipiell sind als Wirtsorganismen neben den vorgenannten transgenen Organismen auch transgene Tiere, vorteilhaft nicht-humane Tiere, geeignet wie beispielsweise *C. elegans*.

Nutzbare Wirtszellen sind weiterhin genannt in: Goeddel, Gene Expression Technology: 10 Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Verwendbare Expressionsstämme z.B. solche, die eine geringere Proteaseaktivität aufweisen sind beschrieben in: Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.

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

20 Transgene Pflanzen, die die im erfindungsgemäßen Verfahren synthetisierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthalten, können vorteilhaft direkt vermarktet werden, ohne dass die synthetisierten Öle, Lipide oder Fettsäuren isoliert werden müssen. Diese Form der Vermarktung ist besonders vorteilhaft.

25

- 41 -

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

- 42 -

der im Produkt verbliebenen Lauge mit Wasser gründlich gewaschen und getrocknet. Um die noch im Produkt enthaltenen Farbstoffe zu entfernen, werden die Produkte einer Bleichung mit beispielsweise Bleicherde oder Aktivkohle unterzogen. Zum Schluss wird das Produkt noch beispielsweise mit Wasserdampf desodoriert.

5

Vorzugsweise sind die durch dieses Verfahren produzierten PUFAs bzw. LCPUFAs C18-, C20- und/oder C22-Fettsäuremoleküle, vorteilhaft C20-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Diese C18-, C20- oder C22-Fettsäuremoleküle lassen sich aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure isolieren. Geeignete Organismen sind
10 beispielsweise die vorstehend erwähnten. Bevorzugte Organismen sind transgene Pflanzen.

Eine Ausführungsform der Erfindung sind deshalb Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, besonders bevorzugt
15 Öl, Lipid oder eine Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs umfassen und von transgenen Pflanzen herrühren. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung besteht in der Verwendung dieser Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, zur Herstellung von Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika, diätetischen Nahrungsergänzungsmitteln oder Pharmazeutika.

20

Diese Öle, Lipide oder Fettsäuren enthalten wie oben beschrieben vorteilhaft 6 bis 15 % Palmitinsäure, 1 bis 6 % Stearinsäure; 7 bis 85 % Ölsäure; 0,5 bis 8 % Vaccensäure, 0,1 bis 1 % Arachinsäure, 7 bis 25 % gesättigte Fettsäuren, 8 bis 85 % einfach ungesättigte Fettsäuren und 60 bis 85 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren, jeweils bezogen auf 100 % und auf den Gesamtfettsäuregehalt des Organismus. Als vorteilhafte mehrfach ungesättigte Fettsäure sind in den Fett-
25

- 43 -

säureester bzw. Fettsäuregemischen wie Phosphatidylfettsäureester oder Triacylglyceridester bevorzugt mindestens 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 oder 20 Gew.-% bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt an Arachidonsäure und/oder mindestens 20, 22, 24 oder 25, vorteilhaft mindestens 26, 28 oder 30, besonders vorteilhaft mindestens 32, 34, 36, 38 oder 40, ganz besonders vorteilhaft mindestens 42, 44, 45 Gew.-% oder mehr bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt an Eicosapentaensäure enthalten.

Weiterhin enthalten die Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, vorteilhaft Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe der Fettsäuren

10 Erucasäure (13-Docosaensäure), Sterculinsäure (9,10-Methylene octadec-9-enonsäure), Malvalinsäure (8,9-Methylen Heptadec-8-enonsäure), Chaulmoogrinsäure (Cyclopentendodecansäure), Furan-Fettsäure (9,12-Epoxy-octadeca-9,11-dienonsäure), Vernonsäure (9,10-Epoxyoctadec-12-enonsäure), Tarinsäure (6-Octadecynonsäure), 6-Nonadecynonsäure, Santalbinsäure (t11-Octadecen-9-ynoic acid), 6,9-Octadecenynonsäure, Pyrulinsäure (t10-Heptadecen-8-ynonsäure), Crepenyninsäure (9-Octadecen-12-ynonsäure), 13,14-Dihydro-15 oropheinsäure, Octadecen-13-ene-9,11-diyonsäure, Petroselensäure (cis-6-Octadecenonsäure), 9c,12t-Octadecadiensäure, Calendulasäure (8t10t12c-Octadecatriensäure), Catalpinsäure (9t11t13c-Octadecatriensäure), Eleosterinsäure (9c11t13t-Octadecatriensäure), Jacarinsäure (8c10t12c-Octadecatriensäure), Punicinsäure (9c11t13c-Octadecatriensäure), Parinarinsäure (9c11t13t15c-Octadecatetraensäure), Pinolensäure (all-cis-5,9,12-Octadecatriensäure), Labaliensäure (5,6-Octadecadienallensäure), Ricinolsäure (12-Hydroxyölsäure) und/oder Coriolinsäure (13-Hydroxy-9c,11tOctadecadienonsäure). Die vorgenannten Fettsäuren kommen in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemischen in der Regel vorteilhaft nur in Spuren vor, das heißt sie kommen bezogen auf die

25 Gesamtfettsäuren zu weniger als 30 %, bevorzugt zu weniger als 25 %, 24 %, 23 %, 22 % oder

- 44 -

- 21 %, besonders bevorzugt zu weniger als 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7%, 6 % oder 5%, ganz besonders bevorzugt zu weniger als 4 %, 3 %, 2 % oder 1 % vor. In einer weiteren bevorzugten Form der Erfindung kommen diese vorgenannten Fettsäuren bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6% oder 0,5%, besonders bevorzugt zu weniger als 0,4%, 0,3%,
5 0,2%, 0,1% vor. Vorteilhaft enthalten die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische weniger als 0,1 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren und/oder keine Butterbuttersäure, kein Cholesterin, keine Clupanodonsäure (= Docosapentaensäure, C22:5 Δ 4,8,12,15,21) sowie keine Nisinsäure (Tetracosahexaensäure, C23:6 Δ 3,8,12,15,18,21).
- 10 Vorteilhaft enthalten die erfindungsgemäßen Öle, Lipide oder Fettsäuren mindestens 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% oder 5%, vorteilhaft mindestens 6%, 7%, 8%, 9% oder 10%, besonders vorteilhaft mindestens 11%, 12%, 13%, 14% oder 15% ARA oder mindestens 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4% oder 5%, vorteilhaft mindestens 6%, oder 7%, besonders vorteilhaft mindestens 8%, 9% oder 10%
- 15 EPA und/oder DHA bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt des Produktionsorganismus vorteilhaft einer Pflanze, besonders vorteilhaft einer Ölfrucht pflanze wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersafflor, Flachs, Hanf, Rizinus, Calendula, Erdnuss, Kakaobohne, Sonnenblume oder den oben genannten weiteren einoder zweikeimblättrigen Ölfrucht pflanzen.
- 20 Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung der Öle, Lipide, der Fettsäuren und/oder der Fettsäurezusammensetzung hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika. Die im erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen Öle, Lipide, Fettsäuren oder Fettsäuregemische können in der dem Fachmann bekannten Weise zur Abmischung mit anderen Ölen, Lipiden, Fettsäuren oder
- 25 Fettsäuregemischen tierischen Ursprungs wie z.B. Fischölen verwendet werden. Auch diese so

- 45 -

hergestellten Öle, Lipide, Fettsäuren oder Fettsäuregemische, die aus pflanzlichen und tierischen Bestandteilen bestehen, können zur Herstellung von Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika verwendet werden.

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

- Bei den im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit vorteilhaft mindestens
- 20 zwei, drei, vier oder fünf, besonders vorteilhaft mit vier oder fünf Doppelbindungen handelt es sich wie oben beschrieben vorteilhaft um Fettsäureester beispielsweise um Sphingolipidester, Phosphoglyceridester, Lipidester, Glycolipidester, Phospholipidester, Monoacylglycerinester, Diacylglycerinester, Triacylglycerinester oder sonstige Fettsäureester, bevorzugt handelt es sich um Phospholipidester und/oder Triacylglycerinester.

- 46 -

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

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

Moose und Algen sind die einzigen bekannten Pflanzensysteme, die erhebliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) herstellen. Moose enthalten PUFAs in Membranlipiden, während Algen, algenverwandte Organismen und einige Pilze auch nennenswerte
25

- 47 -

Mengen an PUFAs in der Triacylglycerolfraction akkumulieren. Daher eignen sich Nukleinsäuremoleküle, die aus solchen Stämmen isoliert werden, die PUFAs auch in der Triacylglycerolfraction akkumulieren, besonders vorteilhaft für das erfindungsgemäße Verfahren und damit zur Modifikation des Lipid- und PUFA-Produktionssystems in einem Wirt, insbesondere Pflanzen, wie Ölfuchtpflanzen, beispielsweise Raps, Canola, Lein, Hanf, Soja, Sonnenblumen, Borretsch. Sie sind deshalb vorteilhaft im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbar.

Als Substrate der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit Δ -6-Desaturase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -6-Elongase- und/oder ω -3-Desaturase-Aktivität kodieren, und/oder den weiteren verwendeten Nukleinsäuren wie den Nukleinsäuren, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoADehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) kodieren, eignen sich vorteilhaft C16-, C18- oder C20-Fettsäuren. Bevorzugt werden die im Verfahren als Substrate umgesetzten Fettsäuren in Form ihrer Acyl-CoA-Ester und/oder ihrer Phospholipid-Ester umgesetzt.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen langkettigen PUFAs müssen die gesättigten, einfach ungesättigten C16-Fettsäuren und/oder mehrfach ungesättigten C18-Fettsäuren zunächst je nach Substrat durch die enzymatische Aktivität einer Desaturase und/oder Elongase zunächst desaturiert und/oder elongiert oder nur desaturiert und anschließend über eine Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert werden. Nach einer Elongationsrunde führt diese

- 48 -

Enzymaktivität entweder ausgehend von C16-Fettsäuren zu C18-Fettsäuren oder ausgehend von C18-Fettsäuren zu C20-Fettsäuren, und nach zwei Elongationsrunden ausgehend von C16-Fettsäuren zu C20-Fettsäuren. Die Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Desaturasen und Elongasen führt vorzugsweise zu C18- und/oder C20-Fettsäuren vorteilhaft mit
5 mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier oder fünf Doppelbindungen, besonders bevorzugt zu C20-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen im Fettsäuremolekül. Besonders bevorzugt als Produkte des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Dihomo- γ -linolensäure, Arachidonsäure und/oder Eicosapentaensäure. Die C18-Fettsäuren mit
10 mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße enzymatische Aktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglycerin, Diacylglycerin oder Triacylglycerin, verlängert werden.

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

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

- 49 -

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

5 Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für eine Δ -5-Desaturase bzw. eine Δ -6-Desaturase kodieren, können im Verfahren die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens um 5 %, bevorzugt mindestens um 10 %, besonders bevorzugt mindestens um 20 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 50 % gegenüber dem Wildtyp der Organismen, die die Nukleinsäuren nicht rekombinant enthalten, erhöht werden.

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

Werden im erfindungsgemäßen Verfahren als Organismen Mikroorganismen verwendet, so werden sie je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw.
20 gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, bevorzugt zwischen 10°C und 60°C unter Sauerstoff-
25 begasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einem festen Wert gehalten

- 50 -

werden, das heißt während der Anzucht reguliert werden oder nicht. Die Anzucht kann batch weise, semi batch weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nachgefüttert werden. Die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren können nach dem Fachmann bekannten
5 Verfahren wie oben beschrieben aus den Organismen isoliert werden. Beispielsweise über Extraktion, Destillation, Kristallisation, ggf. Salzfällung und/oder Chromatographie. Die Organismen können dazu vorher noch vorteilhaft aufgeschlossen werden.

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

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

Das erfindungsgemäße Verfahren kann batchweise, semi-batchweise oder kontinuierlich betrieben werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag,
20 Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im
25 Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der American Society für Bacteriology

- 51 -

(Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

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

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

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

25 Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die

- 52 -

Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen.

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

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Chelatbildner
10 können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

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

- 53 -

DIFCO) und dergleichen.

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

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

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

- 54 -

Die Fermentationsbrühe kann anschließend weiterverarbeitet werden. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden. Vorteilhaft wird die Biomasse nach Abtrennung
5 aufgearbeitet.

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

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

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuremoleküle umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit Δ -6-Desaturaseaktivität kodiert, ausgewählt aus
20 der Gruppe bestehend aus:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, und
- c) Derivaten der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit
25 mindestens 68 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2 kodieren und eine Δ -6-

- 55 -

Desaturaseaktivität aufweisen.

Die im Rahmen dieser Erfindung aufgefundenen Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit Δ -6-Desaturaseaktivität kodieren, kodieren für ein Polypeptid, das sich von bekannten Lipid-abhängigen Desaturasen durch einen sehr hohen Substratumsatz (35% Desaturierung) aus-
5 zeichnet. Im Unterscheid zu beispielsweise der Δ -6-Desaturase aus *Ostreococcus tauri* zeigt die erfindungsgemäße Δ -6-Desaturase aus *M. squamata* eine deutlich höhere Substratspezifität. Die die erfindungsgemäße Δ -6-Desaturase setzt nur $18:3^{\Delta 9,12,15}$ zu $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ um, wohingegen die Δ 6-Desaturase aus *Ostreococcus tauri* auch $18:2^{\Delta 9,12}$ als Substrat akzeptiert. Der Vorteil ist, dass
10 man durch die erfindungsgemäße Δ -6-Desaturase aus *M. squamata* eine gezieltere Produktion von ω 3-Fettsäuren erreichen kann (siehe Figur 1).

Hohe Substratspezifität der erfindungsgemäßen Δ -6-Desaturase bedeutet im Rahmen dieser Erfindung, dass das Substrat $18:3^{\Delta 9,12,15}$ deutlich stärker umgesetzt wird als $18:2^{\Delta 9,12}$. Bevorzugt
15 wird $18:3^{\Delta 9,12,15}$ 1,5-fach, 2-fach, 4-fach, 6-fach, 8-fach oder 10-fach, besonders bevorzugt 12-fach, 15-fach oder 20-fach stärker akzeptiert und umgesetzt als $18:2^{\Delta 9,12}$.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuremoleküle umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit Δ -5-Desaturaseaktivität kodiert, ausgewählt aus
20 der Gruppe bestehend aus:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, und

- 56 -

c) Derivaten der in SEQ ID NO: 3 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 67 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 4 kodieren und eine Δ -5-Desaturaseaktivität aufweisen.

- 5 Die im Rahmen dieser Erfindung aufgefundene Δ -5-Desaturase-Aktivität ist wie die erfindungsgemäße Δ -6-Desaturase Acyl-CoA-abhängig. Es ist die erste Δ -5-Desaturase-Aktivität, die in einer Mikroalge gefunden wurde.

- Unter "Derivaten" der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen werden insbesondere
10 Nukleinsäuresequenzen verstanden, die unter stringenten Bedingungen mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3 hybridisieren, sowie Fragmente der Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 3.

- Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind Genkonstrukte, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 1 und/oder SEQ ID NO: 3 enthalten, wobei die Nukleinsäure
15 jeweils funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist. Zusätzlich können weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-
20 CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) im Genkonstrukt enthalten sein. Vorteilhaft sind zusätzlich Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der
25 Gruppe der Δ -4-Desaturase, Δ 8-Desaturase, Δ -9-Desaturase, Δ -12-Desaturase, Δ -5-Elongase, Δ -

- 57 -

6-Elongase, Δ -9-Elongase, ω 3-Desaturase und/oder Δ -15-Desaturase enthalten. Bevorzugt ist zumindest eine Δ -6-Elongase im Genkonstrukt enthalten.

5 Vorteilhaft stammen alle im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen aus einem eukaryontischen Organismus wie einer Pflanze, einem Mikroorganismus oder einem Tier. Bevorzugt stammen die Nukleinsäuresequenzen aus der Ordnung Salmoniformes, Algen wie *Mantoniella* oder *Ostreococcus*, Pilzen wie der Gattung *Phytophthora* oder von Diatomeen wie den Gattungen *Thalassiosira* oder *Cryptocodinium*.

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

Zum Einbringen werden die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren vorteilhaft einer Amplifikation und Ligation in bekannter Weise unterworfen. Vorzugsweise geht man in
20 Anlehnung an das Protokoll der Pfu-DNA-Polymerase oder eines Pfu/Taq-DNA-Polymerase-gemisches vor. Die Primer werden in Anlehnung an die zu amplifizierende Sequenz gewählt. Zweckmäßigerweise sollten die Primer so gewählt werden, dass das Amplifikat die gesamte kodogene Sequenz vom Start- bis zum Stop-Kodon umfasst. Im Anschluss an die Amplifikation wird das Amplifikat zweckmäßigerweise analysiert. Beispielsweise kann die Analyse nach
25 gelelektrophoretischer Auftrennung hinsichtlich Qualität und Quantität erfolgen. Im Anschluss

- 58 -

kann das Amplifikat nach einem Standardprotokoll gereinigt werden (z.B. Qiagen). Ein Aliquot des gereinigten Amplifikats steht dann für die nachfolgende Klonierung zur Verfügung. Geeignete Klonierungsvektoren sind dem Fachmann allgemein bekannt. Hierzu gehören insbesondere Vektoren, die in mikrobiellen Systemen replizierbar sind, also vor allem Vektoren, die eine effiziente Klonierung in Hefen oder Pilze gewährleisten, und die stabile Transformation von Pflanzen ermöglichen. Zu nennen sind insbesondere verschiedene für die T-DNA-vermittelte Transformation geeignete, binäre und co-integrierte Vektorsysteme. Derartige Vektorsysteme sind in der Regel dadurch gekennzeichnet, dass sie zumindest die für die Agrobacterium-vermittelte Transformation benötigten vir-Gene sowie die T-DNA begrenzenden Sequenzen (T-DNA-Border) beinhalten. Vorzugsweise umfassen diese Vektorsysteme auch weitere cis-regulatorische Regionen wie Promotoren und Terminatoren und/oder Selektionsmarker, mit denen entsprechend transformierte Organismen identifiziert werden können. Während bei co-integrierten Vektorsystemen vir-Gene und T-DNA-Sequenzen auf demselben Vektor angeordnet sind, basieren binäre Systeme auf wenigstens zwei Vektoren, von denen einer vir-Gene, aber keine T-DNA und ein zweiter T-DNA, jedoch kein vir-Gen trägt. Dadurch sind letztere Vektoren relativ klein, leicht zu manipulieren und sowohl in *E. coli* als auch in *Agrobacterium* zu replizieren. Zu diesen binären Vektoren gehören Vektoren der Serien pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen. Erfindungsgemäß bevorzugt verwendet werden Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV und pCAMBIA. Eine Übersicht über binäre Vektoren und ihre Verwendung gibt Hellens et al., Trends in Plant Science (2000) 5: 446-451. Für die Vektorpräparation können die Vektoren zunächst mit Restriktionsendonuklease(n) linearisiert und dann in geeigneter Weise enzymatisch modifiziert werden. Im Anschluss wird der Vektor gereinigt und ein Aliquot für die Klonierung eingesetzt. Bei der Klonierung wird das enzymatisch geschnittene und erforderlichenfalls gereinigte Amplifikat mit ähnlich präparierten Vektorfragmenten mit Einsatz von Ligase kloniert. Dabei kann ein bestimmtes Nukleinsäurekonstrukt bzw. Vektor- oder Plasmidkonstrukt einen

- 59 -

oder auch mehrere kodogene Genabschnitte aufweisen.

- Vorzugsweise sind die kodogenen Genabschnitte in diesen Konstrukten mit regulatorischen Sequenzen funktional verknüpft. Zu den regulatorischen Sequenzen gehören insbesondere pflanzliche Sequenzen wie die oben beschriebenen Promotoren und Terminatoren. Die Konstrukte lassen sich vorteilhafterweise in Mikroorganismen, insbesondere *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*, unter selektiven Bedingungen stabil propagieren und ermöglichen einen Transfer von heterologer DNA in Pflanzen oder Mikroorganismen.
- 10 Unter der vorteilhaften Verwendung von Klonierungsvektoren können die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die erfinderischen Nukleinsäuren und Nukleinsäurekonstrukte in Organismen wie Mikroorganismen oder vorteilhaft Pflanzen eingebracht werden und damit bei der Pflanzentransformation verwendet werden, wie denjenigen, die veröffentlicht sind in und dort zitiert sind: *Plant Molecular Biology and Biotechnology* (CRC Press, Boca Raton, Florida),
- 15 Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205-225)). Die im Verfahren
- 20 verwendeten Nukleinsäuren, die erfinderischen Nukleinsäuren und Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren lassen sich damit zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Organismen vorteilhaft an Pflanzen verwenden, so dass diese bessere und/oder effizientere Produzenten von PUFAs werden.

- 60 -

- Durch das Einbringen eines ω 3-Desaturase-, Δ 6-Desaturase-, Δ 6-Elongase und/oder Δ 5-Desaturase-Genes in einen Organismus allein oder in Kombination mit anderen Genen kann nicht nur der Biosynthesefluss zum Endprodukt erhöht, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin- und/oder Phosphatidylester-Zusammensetzung erhöht oder de novo geschaffen werden.
- 5 Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer Gene, die am Import von Nährstoffen, die zur Biosynthese einer oder mehrerer Fettsäuren, Ölen, polaren und/oder neutralen Lipiden nötig sind, erhöht sein, so dass die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zellen oder innerhalb des Speicherkompartiments erhöht ist, wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von PUFAs, wie im folgenden beschrieben, weiter gesteigert wird.
- 10 Durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl einer oder mehrerer ω 3-Desaturase-, Δ 6-Desaturase-, Δ 6-Elongase und/oder Δ 5-Desaturase-Gene, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer Gene, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Organismen und
- 15 vorteilhaft aus Pflanzen zu steigern.

- Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuremoleküle kodieren für Proteine oder Teile von diesen, wobei die Proteine oder das einzelne Protein oder Teile davon eine Aminosäuresequenz enthält, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz ist, die in den
- 20 Sequenzen SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 dargestellt ist, so dass die Proteine oder Teile davon noch eine Δ -6-Desaturase- und/oder Δ -5-Desaturase-Aktivität aufweisen. Vorzugsweise haben die Proteine oder Teile davon, die von dem Nukleinsäuremolekül/den Nukleinsäuremolekülen kodiert wird/werden, noch seine/ihre wesentliche enzymatische Aktivität und die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen oder Lipidkörperchen

- 61 -

in Organismen vorteilhaft in Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen.

Die enzymatische Aktivität der erfindungsgemäßen Δ -6-Desaturase und Δ -5-Desaturase bzw. von deren Derivaten lässt sich beispielsweise dadurch bestimmen, dass man das zu testende Enzym in einem geeigneten Wirtsorganismus wie etwa Hefe exprimiert, exogene Substrate ($18:3^{\Delta 9,12,15}$ im Falle der Δ -6-Desaturase und $20:3^{\Delta 8,11,14}$ im Falle der Δ -5-Desaturase) zugibt und nach einer gewissen Inkubationszeit das Fettsäuremuster analysiert. Das Auftreten der Produkte $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ bzw. $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ weist auf eine Δ -6-Desaturase- bzw. Δ -5-Desaturase-Aktivität in den Hefekulturen hin. Details zur experimentellen Durchführung sind den Ausführungsbeispielen der vorliegenden Anmeldung zu entnehmen.

Eine Δ -6-Desaturase bzw. Δ -5-Desaturase im Sinne der vorliegenden Erfindung hat eine enzymatische Aktivität von mindestens 10 %, 15 %, 20 % oder 25 %, bevorzugt 30 %, 35 %, 40 % oder 45 %, besonders bevorzugt 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % oder 75 %, insbesondere bevorzugt 80 %, 82 %, 84 %, 86 % oder 88 % und am meisten bevorzugt 90 %, 92 %, 94 %, 96 %, 98 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 150 %, 180 % oder 200 % der enzymatischen Aktivität der durch SEQ ID No: 1 bzw. 3 kodierten Enzyme.

Vorteilhaft sind die von den Nukleinsäuremolekülen kodierten Proteine zu mindestens 67 %, 68 % oder 69 % und vorzugsweise mindestens etwa 70 %, 74 %, 78 %, 80 % oder 84 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr identisch zu den in SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenzen. Im Sinne der Erfindung ist unter Homologie oder homolog, Identität oder identisch zu verstehen.

- 62 -

Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für das Vergleichen verschiedener Sequenzen stehen dem Fachmann eine Reihe von Programmen, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen zur Verfügung. Dabei liefern die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PiLeUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981))], die im GCG Software-Paket [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind.

Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Diese Einstellungen wurden, falls nicht anders angegeben, immer als Standardeinstellungen für Sequenzvergleiche verwendet.

Unter wesentlicher enzymatischer Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Δ -6-Desaturase oder Δ -5-Desaturase ist zu verstehen, dass sie gegenüber den durch die Sequenz mit SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 und deren Derivate kodierten Proteinen/Enzymen im Vergleich noch mindestens eine enzymatische Aktivität von mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % und ganz besonders 40 % aufweisen und damit am Stoffwechsel von zum Aufbau von Fettsäuren, Fettsäureester wie Diacylglyceride und/oder Triacylglyceride in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanze oder Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über Membranen teilnehmen können, wobei C18-, C20- oder C22-Kohlenstoffketten im Fettsäuremolekül mit Doppelbindungen an mindestens zwei, vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Stellen gemeint sind.

- 63 -

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

Alternativ können im erfindungsgemäßen Verfahren Nucleotidsequenzen verwendet werden, die für eine Δ -6-Desaturase oder Δ -5-Desaturase kodieren und die an eine Nucleotidsequenz, wie in
15 SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 dargestellt, vorteilhaft unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

Für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhafte Nucleinsäuremoleküle können auf der Grundlage ihrer Homologie zu den hier offenbarten Desaturase-Nucleinsäuren unter Verwendung der
20 Sequenzen oder eines Teils davon als Hybridisierungssonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. Dabei können beispielsweise isolierte Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die mindestens 15 Nucleotide lang sind und unter stringenten Bedingungen mit dem Nucleinsäuremolekülen, die eine Nucleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 umfassen, hybridisieren. Es können
25 auch Nucleinsäuren mit mindestens 25, 50, 100, 250 oder mehr Nucleotiden verwendet werden.

- 64 -

Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie hier verwendet, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen, die mindestens 60 % homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, dass Sequenzen, die mindestens etwa 65 %, stärker bevorzugt
5 mindestens etwa 70 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75 % oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6., finden. Ein bevorzugtes, nicht einschränkendes Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in 6 x Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/sodiumcitrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren
10 Waschsritten in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 50 bis 65°C. Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Hybridisierungsbedingungen sich je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn beispielsweise organische Lösungsmittel vorliegen, hinsichtlich der Temperatur und der Konzentration des Puffers unterscheiden. Die Temperatur unterscheidet sich beispielsweise unter "Standard-
15 Hybridisierungsbedingungen" je nach dem Typ der Nukleinsäure zwischen 42°C und 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis 5 x SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel im obengenannten Puffer vorliegt, zum Beispiel 50 % Formamid, ist die Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise
20 zwischen 30°C und 45°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die vorstehend genannten Hybridisierungstemperaturen sind beispielsweise für eine Nukleinsäure mit etwa 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von
25 Formamid bestimmt. Der Fachmann weiss, wie die erforderlichen Hybridisierungsbedingungen anhand von Lehrbüchern, wie dem vorstehend erwähnten oder aus den folgenden Lehrbüchern

Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Harnes und Higgins (Hrsgb.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Hrsgb.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford, bestimmt werden können.

5

Alternativ können im erfindungsgemäßen Verfahren zusätzlich Nukleotidsequenzen verwendet werden, die für eine ω -3-Desaturase, Δ 12-Desaturase, Δ 9-Elongase, Δ 8-Desaturase oder Δ -4-Desaturase kodieren. Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen werden vorteilhaft in einer Expressionskassette, die die Expression der Nukleinsäuren in Organismen wie Mikroorganismen oder Pflanzen ermöglicht, eingebracht.

10

Dabei werden die Nukleinsäuresequenzen, die für eine der genannten Enzymaktivitäten, vorteilhaft eine ω -3-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -5-Desaturase, Δ -6-Elongase, Δ -12-Desaturase, Δ -5-Elongase, Δ -9-Elongase, Δ -8-Desaturase oder Δ -4-Desaturase kodieren, mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen, an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Die Expressionskassette (= Expressionskonstrukt = Genkonstrukt) kann aber auch einfacher

15

20

25

- 66 -

aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten

5 Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen

10 können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die ω -3-Desaturase-, Δ -6-Desaturase-, Δ -5-Desaturase-, Δ -6-Elongase-, Δ -12-Desaturase-, Δ -5-Elongase-, Δ -9-Elongase-, Δ -8-Desaturase- oder Δ -4-Desaturase-Gene können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein. Vorteilhaft liegt nur jeweils eine Kopie der Gene in der Expressionskassette vor. Dieses

15 Genkonstrukt oder die Genkonstrukte können zusammen im Wirtsorganismus exprimiert werden. Dabei kann das Genkonstrukt oder die Genkonstrukte in einem oder mehreren Vektoren inseriert sein und frei in der Zelle vorliegen oder aber im Genom inseriert sein. Es ist vorteilhaft für die Insertion weiterer Gene im Wirtsgenom, wenn die zu exprimierenden Gene zusammen in einem Genkonstrukt vorliegen.

20 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet

25 werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise

- 67 -

die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind ein oder mehrere Genkonstrukte, die eine oder mehrere Sequenzen enthalten, die durch SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 oder dessen Derivate
5 definiert sind und für Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 kodieren. Die genannten $\Delta 6$ -Desaturase- und $\Delta 5$ -Desaturase-Proteine führen dabei vorteilhaft im Zusammenspiel mit weiteren Enzymen der Fettsäure- und Lipidbiosynthese zu einer Desaturierung oder Elongierung von Fettsäuren, wobei das Substrat vorteilhaft ein, zwei, drei, vier, fünf oder sechs
10 Doppelbindungen und vorteilhaft 18, 20 oder 22 Kohlenstoffatome im Fettsäuremolekül aufweist. Gleiches gilt für ihre Homologen, Derivate oder Analoga, die funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen, vorteilhafterweise zur Steigerung der Genexpression, verbunden sind.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das neue Verfahren liegen beispielsweise in Promotoren
15 vor, wie dem cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, Ipp-, lac-, Ipp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, γ -PR- oder γ -PL-Promotor und werden vorteilhafterweise in Gram-negativen Bakterien angewendet. Weitere vorteilhafte Regulations-Sequenzen liegen beispielsweise in den Gram-positiven Promotoren amy und SP02, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al.,
20 Cell 21 (1980) 285- 294], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, Iib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor vor. In diesem Zusammenhang vorteilhaft sind ebenfalls induzierbare Promotoren, wie die in EP-A-0 388 186 (Benzylsulfonamid-induzierbar), Plant J. 2, 1992:397-404 (Gatz et al., Tetracyclininduzierbar), EP-A-0 335 528 (Abzisisäure-induzierbar) oder WO 93/21334 (Ethanol- oder Cyclohexenol-
25 induzierbar) beschriebenen Promotoren. Weitere geeignete Pflanzenpromotoren sind der

- 68 -

Promotor von cytosolischer FBPase oder der ST-LSIPromotor der Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), der Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase-Promotor aus *Glycine max* (Genbank-Zugangsnr. U87999) oder der in EP-A-0 249 676 beschriebene nodienspezifische Promotor. Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, welche die
5 Expression in Geweben ermöglichen, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind. Ganz besonders vorteilhaft sind samenspezifische Promotoren, wie der ausführungsgemäße USP-Promotor, aber auch andere Promotoren wie der LeB4-, DC3-, Phaseolin- oder Napin-Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promotoren, die für monokotyle oder dikotyle Pflanzen verwendet werden können und in US 5,608,152 (Napin-
10 Promotor aus Raps), WO 98/45461 (Oleosin-Promotor aus *Arabidopsis*), US 5,504,200 (Phaseolin-Promotor aus *Phaseolus vulgaris*), WO 91/13980 (Bce4-Promotor aus Brassica), von Bäumlein et al., *Plant J.*, 2, 2, 1992:233-239 (LeB4-Promotor aus einer Leguminose) beschrieben sind, wobei sich diese Promotoren für Dikotyledonen eignen. Die folgenden Promotoren eignen sich beispielsweise für Monokotyledonen: lpt-2- oder lpt-1-Promotor aus
15 Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230), Hordein-Promotor aus Gerste und andere, in WO 99/16890 beschriebene geeignete Promotoren.

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

Um einen besonders hohen Gehalt an PUFAs vor allem in transgenen Pflanzen zu erzielen, sollten die PUFA-Biosynthesegene vorteilhaft samenspezifisch in Ölsaaten exprimiert werden.
25 Hierzu können Samen-spezifische Promotoren verwendet werden, bzw. solche Promotoren, die

- 69 -

im Embryo und/oder im Endosperm aktiv sind. Samenspezifische Promotoren können prinzipiell sowohl aus dikotyledonen als auch aus monokotyledonen Pflanzen isoliert werden. Im Folgenden sind vorteilhafte bevorzugte Promotoren aufgeführt: USP (= unknown seed protein) und Vicilin (*Vicia faba*) [Bäumlein et al., Mol. Gen Genet, 1991 , 225(3)], Napin (Raps) [US 5,608,152],
5 Acyl-Carrier Protein (Raps) [US 5,315,001 und WO 92/18634], Oleosin (*Arabidopsis thaliana*) [WO 98/45461 und WO 93/20216], Phaseolin (*Phaseolus vulgaris*) [US 5,504,200], Bce4 [WO 91/13980], Leguminosen B4 (LegB4-Promotor) [Bäumlein et al., Plant J., 2,2, 1992], Lpt2 und lpt1 (Gerste) [WO 95/15389 u. WO95/23230], Samen-spezifische Promotoren aus Reis, Mais u. Weizen [WO 99/16890], Amy32b, Amy 6-6 und Aleurain [US 5,677,474], Bce4 (Raps)
10 [US 5,530,149], Glycinin (Soja) [EP 571 741], Phosphoenol-Pyruvatcarboxylase (Soja) [JP 06/62870], ADR12-2 (Soja) [WO 98/08962], Isocitratlyase (Raps) [US 5,689,040] oder [alpha]-Amylase (Gerste) [EP 0 781 849]. Die Pflanzengenexpression lässt sich auch über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich
15 besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

20 In einer anderen Ausführungsform werden vorteilhaft Sequenzen für die Expression verwendet, die eine konstitutive Expression in möglichst vielen Geweben der Pflanze ermöglichen wie der CaMV35S-, CaMV36S-, CaMV35Smas-, nos-, mas-, ubi-, stpt-, lea- oder Super-Promotor. Bevorzugt erfolgt die Expression im vegetativen Gewebe wie oben beschrieben. Beispielsweise handelt es sich bei den regulatorischen Sequenzen um Sequenzen, an die Induktoren oder
25 Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen

- 70 -

neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch
5 eine oder mehrere sogenannte "enhancer-Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Vorteilhafte Terminatoren sind beispielweise virale Terminatoren wie der 35S-Terminator oder andere. Die im erfindungsgemäßen Verfahren
10 verwendeten Enzyme bzw. Nukleinsäuren, die diese Enzyme kodieren, können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein. Vorteilhaft liegt nur jeweils eine Kopie der Gene in der Expressionskassette vor. Dieses Genkonstrukt oder die Genkonstrukte können gleichzeitig oder nacheinander in die Pflanze eingebracht werden und zusammen im Wirtsorganismus exprimiert werden. Dabei kann das Genkonstrukt oder die
15 Genkonstrukte in einem oder mehreren Vektoren inseriert sein und frei in der Zelle vorliegen oder aber im Genom inseriert sein. Es ist vorteilhaft für die Insertion weiterer Gene in die Pflanze, wenn die zu exprimierenden Gene zusammen in einem Genkonstrukt vorliegen.

Es versteht sich, dass die Nukleinsäuresequenzen, die für die erfindungsgemäße $\Delta 6$ -Desaturase
20 bzw. $\Delta 5$ -Desaturase und ggf. weitere Enzyme des Lipidstoffwechsels kodieren, auch einzeln in einem Genkonstrukt vorliegen und in eine geeignete Wirtspflanze eingebracht werden können. Diese transformierten Wirtspflanzen können anschließend miteinander verkreuzt werden, um die gewünschte Kombination von Enzymen in den Nachkommen zu erhalten.

- 71 -

Um eine stabile Integration der Biosynthesegene in die transgene Pflanze über mehrere Generationen sicherzustellen, sollte jede der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren unter der Kontrolle eines eigenen, bevorzugt eines unterschiedlichen Promotors exprimiert werden, da sich wiederholende Sequenzmotive zu Instabilität der T-DNA bzw. zu Rekombinationsereignissen führen können. Die Expressionskassette ist dabei vorteilhaft so aufgebaut, dass einem Promotor eine geeignete Schnittstelle zur Insertion der zu exprimierenden Nukleinsäure folgt, vorteilhaft in einem Polylinker. Gegebenenfalls kann ein Terminator hinter dem Polylinker liegen. Diese Abfolge wiederholt sich mehrfach, bevorzugt drei-, vier oder fünfmal, so dass bis zu fünf Gene in einem Konstrukt zusammengeführt werden und so zur Expression in die transgene Pflanze eingebracht werden können. Vorteilhaft wiederholt sich die Abfolge bis zu dreimal. Die Nukleinsäuresequenzen werden zur Expression über die geeignete Schnittstelle beispielsweise im Polylinker hinter den Promotor inseriert. Vorteilhaft hat jede Nukleinsäuresequenz ihren eigenen Promotor und gegebenenfalls ihren eigenen Terminator. Derartige vorteilhafte Konstrukte werden beispielsweise in DE 10102337, DE 10102338 oder WO 2007/017419 offenbart. Es ist aber auch möglich, mehrere Nukleinsäuresequenzen hinter einem Promotor und ggf. vor einem Terminator zu inserieren. Dabei ist die Insertionsstelle bzw. die Abfolge der inserierten Nukleinsäuren in der Expressionskassette nicht von entscheidender Bedeutung, das heißt, eine Nukleinsäuresequenz kann an erster oder letzter Stelle in der Kassette inseriert sein, ohne dass dadurch die Expression wesentlich beeinflusst wird. Es können in der Expressionskassette vorteilhaft unterschiedliche Promotoren wie beispielsweise der USP-, LegB4- oder DC3- Promotor und unterschiedliche Terminatoren verwendet werden. Es ist aber auch möglich nur einen Promotortyp in der Kassette zu verwenden. Bei konstitutiver Expression kann auch mehrmals der CaMV35S-Promotor verwendet werden.

- 72 -

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

Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene umfassen, die in die Organismen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und vorteilhaft, in die Wirtsorganismen Regulationsgene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch ihre
10 Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und darin zu exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Weiterhin können vorteilhaft im Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthalten sein oder aber diese Gene können auf einem weiteren oder mehreren weiteren Nukleinsäurekonstrukten liegen.
15 Vorteilhaft werden als Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ein Gen ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lyso-
phospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-
Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-
20 Acetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) oder deren Kombinationen verwendet. Besonders vorteilhafte Nukleinsäuresequenzen sind Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe der Acyl-CoA:Lyso-
phospholipid-Acyltransferase, Δ -4-Desaturase, Δ -5-Desaturase, Δ -6-Desaturase, Δ -9-Desaturase, Δ -12-Desaturase, Δ -5-

- 73 -

Elongase und/oder Δ -6-Elongase.

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

Die Expressionskassetten können prinzipiell direkt zum Einbringen in die Pflanze verwendet
werden oder aber in einem Vektor eingebracht werden. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff
"Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, an welche
10 es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", was für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-
Schleife steht, in die zusätzlichen DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp
ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden
können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind,
autonom replizieren (z.B. Bakterienvektoren mit bakteriellem Replikationsursprung). Andere
15 Vektoren werden vorteilhaft beim Einbringen in die Wirtszelle in das Genom einer Wirtszelle
integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte
Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese
Vektoren werden hier als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben Expressions-
vektoren, die für DNA-Rekombinationstechniken geeignet sind, die Form von Plasmiden. In der
20 vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da
das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch auch andere
Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren, die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen.
Ferner soll der Begriff Vektor auch andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wie
Phagen, Viren, wie SV40, CMV, TMV, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide,

- 74 -

Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA, umfassen.

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

- 75 -

Die verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen gestaltet sein. Dies ist vorteilhaft, da häufig Zwischenschritte der Vektorkonstruktion der Einfachheit halber in Mikroorganismen durchgeführt werden. Beispielsweise können die erfindungsgemäßen

5 Gene und andere Gene des Fettsäure- und Lipidstoffwechsels in bakteriellen Zellen, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanos, M.A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet & L. L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428:

10 Academic Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer Systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J. F., et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), Algen (Falciaiore et al., 1999, *Marine Biotechnology*.1 , 3:239-251), Ciliaten der Typen: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctoria, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucoma, Platyophrya,

15 Potomacus, Desaturaseudocohnilembus, Euplotes, Engelmanieila und Stylonychia, insbesondere der Gattung Stylonychia lemnae, mit Vektoren nach einem Transformationsverfahren, wie beschrieben in WO 98/01572, sowie bevorzugt in Zellen vielzelliger Pflanzen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants" *Plant Cell Rep.*:583-586; *Plant Molecular*

20 *Biology and Biotechnology*, C Press, Boca Raton, Florida, Kapitel 6/7, S.71-119 (1993); F.F. White, B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Bd. 1 , Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205-225 (und darin zitierte Literaturstellen)) exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden ferner erörtert in Goeddel, *Gene Expression*

25 *Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der

- 76 -

rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, zum Beispiel unter Verwendung von T7-Promotor-Regulationssequenzen und T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert werden.

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

- Beispiele für geeignete induzierbare nicht-Fusions-E. coli-Expressionsvektoren sind u.a. pTrc (Amann et al. (1988) *Gene* 69:301-315) und pET 11d (Studier et al., *Gene Expression
15 Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Die Zielgenexpression vom pTrc-Vektor beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET 11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird
20 in den Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten [lambda]-Prophagen bereitgestellt, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt. Andere in prokaryotischen Organismen geeignete Vektoren sind dem Fachmann bekannt, diese Vektoren sind beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, die pBRReihe, wie pBR322, die pUC-Reihe, wie pUC18 oder pUC19, die M13mp-Reihe, pKC30, pRep4, pHS1 ,
25 pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-111113-B1, γ gt11 or pBdCI, in Streptomyces

- 77 -

plJ101 , plJ364, plJ702 oder plJ361 , in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667. Bei einer weiteren Ausführungsform ist der Expressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYeDesaturated (Baldari et al. (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan und
5 Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie den filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer Systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied
10 Molecular Genetics of fungi*, J. F. Peberdy et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, oder in: *More Gene Manipulations in Fungi* [J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic Press: San Diego]. Weitere geeignete Hefevektoren sind beispielsweise pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLYe23.

15 Alternativ können die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (z.B. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3: 2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) *Virology* 170: 31-39).

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

Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

5 Auch können die im Verfahren verwendeten Gene in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1 (3):239-251 und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus höheren Pflanzen (z.B. Spermatophyten, wie Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 10 20:1195- 1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", *Nucl. Acids Res.* 12:8711-8721; *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

15 Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzenzellen steuern können und funktionsfähig verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription, erfüllen kann, beispielsweise Polyadenylierungssignale. Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus *Agrobacterium tumefaciens*-T-DNA stammen, wie das als Octopinsynthese bekannte Gen 3 20 des Ti-Plasmids pTiACH[delta] (Gielen et al. (1984) *EMBO J.* 3: 835ff.) oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch alle anderen in Pflanzen funktionell aktiven Terminatoren sind geeignet.

Da die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebene beschränkt ist, enthält eine 25 Pflanzen-Expressionskassette vorzugsweise andere funktionsfähig verbunden Sequenzen, wie

- 79 -

Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaikvirus, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht, enthält (Gallie et al. (1987) Nucl. Acids Research 15:8693-8711).

- 5 Das inserierte Gen muss wie oben beschrieben funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise durchführt. Nutzbare Promotoren sind konstitutive Promotoren (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202), wie diejenigen, die von Pflanzenviren stammen, wie 35S CaMV (Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (siehe auch US 5,352,605 und WO 84/02913) oder Pflanzen-
- 10 promotoren, wie der in US 4,962,028 beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.

Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktionsfähigen Verbindung in Pflanzengenexpressions-Kassetten sind Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des Genproduktes in sein entsprechendes Zellkompartiment notwendig sind (siehe eine Übersicht

15 in Kermode, Crit. Rev. Plant Sei. 15, 4 (1996) 285-423 und darin zitierte Literaturstellen), beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen.

20

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch wie oben beschrieben über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche

25 Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-

- 80 -

induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2: 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor. Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind geeignete Promotoren, beispielsweise der pathogeninduzierte PRP1 -Gen-Promotor (Ward et al. (1993) Plant. Mol. Biol. 22: 361-366), der hitzeinduzierbare hsp80- Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alpha-Amylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinll-Promotor (EP-A-0 375 091).

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

Insbesondere kann die multiparallele Expression der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen gewünscht sein. Die Einführung solcher Expressionskassetten kann über eine simultane Transformation mehrerer einzelner Expressionskonstrukte erfolgen oder bevorzugt

- 81 -

durch Kombination mehrerer Expressionskassetten auf einem Konstrukt. Auch können mehrere Vektoren mit jeweils mehreren Expressionskassetten transformiert und auf die Wirtszelle übertragen werden.

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

10

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

Der Begriff "Nukleinsäure(molekül)", wie hier verwendet, umfasst in einer vorteilhaften
25 Ausführungsform zudem die am 3'- und am 5'-Ende des kodierenden Genbereichs gelegene

- 82 -

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

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuremoleküle, z.B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 oder eines Teils davon, kann unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Auch kann mit Hilfe von Vergleichsalgorithmen beispielsweise eine homologe Sequenz oder homologe, konservierte Sequenzbereiche auf DNA- oder Aminosäureebene identifiziert werden. Diese können als Hybridisierungsprobe in Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) zur Isolierung weiterer im Verfahren nützlicher Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz der SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei Oligonukleotidprimer auf der Basis dieser Sequenz

- 83 -

oder von Teilen davon verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die vollständige Sequenz oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz erstellt worden sind). Zum Beispiel lässt sich mRNA aus Zellen isolieren (z.B. durch das Guanidinium-thiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* 18:5294-5299) und cDNA mittels Reverser Transkriptase (z.B. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL) herstellen. Synthetische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion lassen sich auf der Basis einer der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 gezeigten Sequenzen oder mit Hilfe der in SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenzen erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ von genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer Desaturase-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, beispielsweise mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

Homologe der verwendeten Desaturase-Nukleinsäuresequenzen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 bedeutet beispielsweise allelische Varianten mit mindestens 67 %, 68 % oder 69 %, bevorzugt mindestens etwa 70 %, 74 %, 78 %, 80 % oder 84 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Identität bzw. Homologie zu einer in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 gezeigten Nukleotidsequenzen oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga oder Teilen davon. Weiterhin sind isolierte Nuklein-

- 84 -

säuremoleküle einer Nukleotidsequenz, die an eine der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 gezeigten Nukleotidsequenzen oder einen Teil davon hybridisieren, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Unter einem Teil gemäß der Erfindung ist dabei zu verstehen, dass mindestens 25 Basenpaare (= bp), 50 bp, 75 bp, 100 bp, 125 bp oder 150 bp, bevorzugt
5 mindestens 175 bp, 200 bp, 225 bp, 250 bp, 275 bp oder 300 bp, besonders bevorzugt 350 bp, 400 bp, 450 bp, 500 bp oder mehr Basenpaare für die Hybridisierung verwendet werden. Es kann auch vorteilhaft die Gesamtsequenz verwendet werden. Allelische Varianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus/in der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz erhalten
10 lassen, wobei aber die Absicht ist, dass die Enzymaktivität der davon herrührenden synthetisierten Proteine für die Insertion eines oder mehrerer Gene vorteilhafterweise beibehalten wird. Proteine, die noch die enzymatische Aktivität der Δ -6-Desaturase oder Δ -5-Desaturase besitzen, das heißt deren Aktivität im wesentlichen nicht reduziert ist, bedeutet Proteine mit mindestens 10 %, vorzugsweise 20 %, besonders bevorzugt 30 %, ganz besonders bevorzugt
15 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % der ursprünglichen Enzymaktivität, verglichen mit dem durch SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 kodierten Protein.

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

Homologen der SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 bedeutet auch Derivate, wie beispielsweise Promotorvarianten. Die Promotoren stromaufwärts der angegebenen Nukleotidsequenzen können durch einen oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en)
25 modifiziert werden, ohne dass jedoch die Funktionalität oder Aktivität der Promotoren gestört

- 85 -

wird. Es ist weiterhin möglich, dass die Aktivität der Promotoren durch Modifikation ihrer Sequenz erhöht ist oder dass sie vollständig durch aktivere Promotoren, sogar aus heterologen Organismen, ersetzt werden.

- 5 Die vorgenannten Nukleinsäuren und Proteinmoleküle mit Δ -6-Desaturase- oder Δ -5-Desaturase-Aktivität, die am Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren, PUFA-Cofaktoren und Enzymen oder am Transport lipophiler Verbindungen über Membranen beteiligt sind, werden im erfindungsgemäßen Verfahren zur Modulation der Produktion von PUFAs in transgenen Organismen vorteilhaft in Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste,
10 Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Linum-Arten wie Öl- oder Faserlein, Brassica-Arten, wie Raps, Canola und Rübsen, Pfeffer, Sonnenblume, Borretsch, Nachtkerze und Tagetes, Solanacaen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Maniok, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernden Gräsern und Futterfeldfrüchten, entweder direkt (z.B. wenn die Überexpression oder
15 Optimierung eines Fettsäurebiosynthese-Proteins einen direkten Einfluss auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Fettsäure aus modifizierten Organismen hat) verwendet und/oder können eine indirekt Auswirkung haben, die dennoch zu einer Steigerung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der PUFAs oder einer Abnahme unerwünschter Verbindungen führt (z.B. wenn die Modulation des Stoffwechsels von Lipiden
20 und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen zu Veränderungen der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammensetzung der gewünschten Verbindungen innerhalb der Zellen führt, was wiederum die Produktion einer oder mehrerer Fettsäuren beeinflussen kann).

- 86 -

Die Kombination verschiedener Vorläufermoleküle und Biosyntheseenzyme führt zur Herstellung verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine entscheidende Auswirkung auf die Zusammensetzung der Lipide hat.

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

10

Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat sowie die Addition oder Modifikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Membranen verwendet werden, umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der

- 15 Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase. Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden

Produktmoleküle zusammen Acetoacetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so dass ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der

- 20 ungesättigten Fettsäuren aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert,

und zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (bezüglich der Fettsäuresynthese in Mikroorganismen siehe F. C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli* und *Salmonella*.

ASM Press: Washington, D. C. S. 612-636 und darin enthaltene Literaturstellen; Lengeier et al. (Hrsgb.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, und die enthaltene

- 25 Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993) *Microbiological Reviews* 57:522-542 und

- 87 -

die enthaltenen Literaturstellen). Die so hergestellten an Phospholipide gebundenen Fettsäuren müssen anschließend wieder für die weiteren Elongationen aus den Phospholipiden in den FettsäureCoA-Ester-Pool überführt werden. Dies ermöglichen Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen. Weiterhin können diese Enzyme die elongierten Fettsäuren wieder von den
5 CoA-Estem auf die Phospholipide übertragen. Diese Reaktionsabfolge kann gegebenenfalls mehrfach durchlaufen werden.

Vorläufer für die PUFA-Biosynthese sind beispielsweise Ölsäure, Linol- und Linolensäure. Diese C18-Kohlenstoff-Fettsäuren müssen auf C20 und C22 verlängert werden, damit Fettsäuren vom
10 Eicosa- und Docosa-Kettentyp, insbesondere ARA und EPA erhalten werden. Mit Hilfe der im Verfahren verwendeten Desaturasen und/oder Elongase können Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure, vorteilhaft Eicosapentaensäure, Arachidonsäure und/oder Docosahexaensäure hergestellt werden und anschließend für verschiedene Zwecke bei Nahrungsmittel-, Futter-, Kosmetik- oder pharmazeutischen Anwendungen
15 verwendet werden. Mit den genannten Enzymen können C20- und/oder C22-Fettsäuren mit mindestens zwei, vorteilhaft mindestens drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise C20- oder C22-Fettsäuren mit vorteilhaft vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül hergestellt werden. Die Desaturierung kann vor oder nach
20 Elongation der entsprechenden Fettsäure erfolgen. Daher führen die Produkte der Desaturaseaktivitäten und der möglichen weiteren Desaturierung und Elongation zu bevorzugten PUFAs mit höherem Desaturierungsgrad, einschließlich einer weiteren Elongation von C20 zu C22-Fettsäuren, zu Fettsäuren wie γ -Linolensäure, Dihomo- γ -linolensäure, Arachidonsäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Substrate der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Desaturasen und Elongasen sind C16-, C18- oder C20-Fettsäuren wie
25 zum Beispiel Linolsäure, γ -Linolensäure, α -Linolensäure, Dihomo- γ -linolensäure, Eicosatetra-

- 88 -

ensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure, γ -Linolensäure und/oder α -Linolensäure, Dihomo- γ -linolensäure bzw. Arachidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicospentaensäure. Die synthetisierten C20- oder C22- Fettsäuren mit mindestens zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen in der Fettsäure fallen im erfindungsgemäßen Verfahren in Form der freien Fettsäure oder in Form ihrer Ester beispielsweise in Form ihrer Glyceride an.

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

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

Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationsorte transportiert und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen (1998) Lipid, 100(4-5): 161 -166).

Veröffentlichungen über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese, Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Betaoxidation,

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

Die im Verfahren hergestellten PUFAs, umfassen eine Gruppe von Molekülen, die höhere Tiere nicht mehr synthetisieren können und somit aufnehmen müssen oder die höhere Tiere nicht mehr ausreichend selbst herstellen können und somit zusätzlich aufnehmen müssen, obwohl sie leicht 15 von anderen Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden, beispielsweise können Katzen Arachidonsäure nicht mehr synthetisieren.

Unter Phospholipiden im Sinne der Erfindung sind zu verstehen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin und/oder Phosphatidylinositol 20 vorteilhafterweise Phosphatidylcholin. Die Begriffe Produktion oder Produktivität sind im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Konzentration des Fermentationsproduktes, das in einer bestimmten Zeitspanne und einem bestimmten Fermentationsvolumen gebildet wird (z.B. kg Produkt pro Stunde pro Liter). Es umfasst auch die Produktivität innerhalb einer Pflanzenzelle oder einer Pflanze, das heißt den Gehalt an den gewünschten im Verfahren hergestellten 25 Fettsäuren bezogen auf den Gehalt an allen Fettsäuren in dieser Zelle oder Pflanze. Der Begriff

- 90 -

Effizienz der Produktion umfasst die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten Produktionsmenge nötig ist (z.B. wie lange die Zelle zur Aufrichtung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff Ausbeute oder Produkt/Kohlenstoff-Ausbeute ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das
5 Produkt (d.h. die Feinchemikalie). Dies wird gewöhnlich beispielsweise ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Erhöhen der Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewonnenen Moleküle oder der geeigneten gewonnenen Moleküle dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe Biosynthese oder Biosyntheseweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die
10 Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle aus Zwischenverbindungen, beispielsweise in einem Mehrschritt und stark regulierten Prozess. Die Begriffe Abbau oder Abbauweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger komplexe Moleküle) beispielsweise in einem
15 Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Der Begriff Stoffwechsel ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Stoffwechsel einer bestimmten Verbindung (z.B. der Stoffwechsel einer Fettsäure) umfasst dann die Gesamtheit der Biosynthese-, Modifikations- und Abbauwege dieser Verbindung in der Zelle, die diese Verbindung betreffen.

20 Die Desaturierungseffizienz im Rahmen der Erfindung lässt sich berechnen durch die Formel $(\text{Produkt} \times 100) / (\text{Edukt} + \text{Produkt})$.

Zur Bestimmung der prozentualen Homologie (= Identität) von zwei Aminosäuresequenzen (z.B.
25 einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4) oder von zwei Nukleinsäuren (z.B.

- 91 -

SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3) werden die Sequenzen zum Zweck des optimalen Vergleichs untereinander geschrieben (z.B. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nucleinsäure eingefügt werden, um ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nucleinsäure zu erzeugen). Die Aminosäurereste oder Nucleotide an den entsprechenden Aminosäurepositionen oder Nucleotidpositionen werden dann verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz durch den gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nucleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz belegt wird, dann sind die Moleküle an dieser Position homolog (d.h. Aminosäure- oder Nucleinsäure-"Homologie", wie hier verwendet, entspricht Aminosäure- oder Nucleinsäure-"Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl an identischen Positionen, die den Sequenzen gemeinsam sind (d.h. % Homologie = Anzahl der identischen Positionen/Gesamtanzahl der Positionen x 100). Die Begriffe Homologie und Identität sind damit als Synonym anzusehen. Die verwendeten Programme bzw. Algorithmen sind oben beschrieben.

Ein isoliertes Nucleinsäuremolekül, das für eine Δ -6-Desaturase oder Δ -5-Desaturase kodiert, die zu einer Proteinsequenz der SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 homolog ist, kann durch Einbringen einer oder mehrerer Nucleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nucleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 erzeugt werden, so dass eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das kodierte Protein eingebracht werden. Mutationen können in eine der Sequenzen der SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 durch Standardtechniken, wie stellenspezifische Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäureresten hergestellt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest gegen einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von

- 92 -

Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seitenketten, (z.B. Alanin, Valin, 5 Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einer Δ -6-Desaturase oder Δ -5-Desaturase wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. Alternativ können bei einer anderen 10 Ausführungsform die Mutationen zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der für die Δ -6-Desaturase oder Δ -5-Desaturase kodierenden Sequenz eingebracht werden, z.B. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können nach der hier beschriebenen Δ -6-Desaturase oder Δ -5-Desaturase-Aktivität durchmustert werden, um Mutanten zu identifizieren, die die Δ -6-Desaturase oder Δ -5-Desaturase-Aktivität beibehalten haben. Nach der Mutagenese 15 einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 kann das kodierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann z.B. unter Verwendung der hier beschriebenen Tests bestimmt werden. Danach wird in der Regel die Aktivität durch Expression der entsprechenden cDNA in einem Organismus wie Hefe und anschließender Fettsäureanalyse nachgewiesen.

20

Weitere Erfindungsgegenstände sind transgene nicht-humane Organismen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 enthalten oder ein Genkonstrukt oder ein Vektor, die diese erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten. Vorteilhaft handelt es sich bei dem nicht-humanen Organismus um einen Mikroorganismus, ein 25 nicht-humanes Tier oder eine Pflanze, besonders bevorzugt um eine Pflanze. Beispiele für

- 93 -

geeignete Pflanzen wurden bereits genannt.

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

Beispiele

10 Beispiel 1 : Allgemeine Klonierungsverfahren

Die Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose- und Nylon-Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli-Zellen,
15 Anzucht von Bakterien und die Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0- 87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 2: Sequenzanalyse rekombinanter DNA

20

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

- 94 -

und überprüft.

Beispiel 3: Lipidextraktion aus Hefen und Samen

- 5 Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen oder Ciliaten auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. von Lipiden oder
- 10 einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al. (1987)
- 15 "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bio-
- 20 separations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J. F., und Cabral, J. M. S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J. D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, FJ. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications). Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sei. USA 96 (22): 12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic
- 25 Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder

- 95 -

Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W., *Advances in Lipid Methodology*, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., *Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide* - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 5 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz der 10 Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied 15 Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P. F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC- 20 MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder 25 TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in:

- 96 -

Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353). Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 Mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

15 Pflanzenmaterial wird zunächst mechanisch durch Mörsern homogenisiert, um es einer Extraktion zugänglicher zu machen. Dann wird 10 min auf 100°C erhitzt und nach dem Abkühlen auf Eis erneut sedimentiert. Das Zellsediment wird mit 1 M methanolischer Schwefelsäure und 2 % Dimethoxypropan 1 h bei 90°C hydrolysiert und die Lipide transmethyliert. Die resultierenden Fettsäuremethylester (FAME) werden in Petrolether extrahiert.

20 Die extrahierten FAME werden durch Gasflüssigkeitschromatographie mit einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) und einem Temperaturgradienten von 170°C auf 240°C in 20 min und 5 min bei 240°C analysiert. Die Identität der Fettsäuremethylester wird durch Vergleich mit entsprechenden FAME-Standards (Sigma) bestätigt. Die Identität und die Position der Doppelbindung kann durch geeignete chemische

- 97 -

Derivatisierung der FAME-Gemische z.B. zu 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie (1998) Chem. Phys. Lipids 94, 35-41) mittels GC-MS weiter analysiert werden.

Beispiel 4: Klonierung von Desaturase-Genen aus *Mantoniella squamata*

5

Mantoniella squamata (Manton *et* Parke), Desikachary, wurde von der Algenkultursammlung Göttingen (SAG, Deutschland) bezogen. Nicht-axenische Kulturen wurde in Batch-Kulturen unter Langtaglicht (14 h)-Bedingungen mit $45 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in 50-200 ml Brackish Water-Medium (1/2 SWES), ergänzt mit Bodenextrakt, bei 20 °C angezogen. Die Biomasse wurde durch Zentrifugieren geerntet und zur Gesamt-RNA-Isolierung verwendet.

10

Gesamt-RNA wurde aus einer 7 Tage alten *M. squamata*-Kultur unter Einsatz des RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) extrahiert. Poly A+ RNA wurde aus der Gesamt-RNA mittels Oligo-dT-Cellulose (Sambrook *et al.*, 1989, *vide supra*) isoliert. Reverse Transcription wurde unter Verwendung des Reverse Transcription Kit von Promega durchgeführt und die erhaltene cDNA wurde in den lambda ZAP-Vector (lambda ZAP Gold, Stratagene) nach den Angaben des Herstellerprotokolls inseriert. Nach *in vivo* mass excision der cDNA-Bibliothek, Plasmidgewinnung und Transformation von *Escherichia coli* wurde Plasmid-DNA auf einem Qiagen DNA-Aufreinigungsroboter (Qiagen, Hilden, Germany) nach den Herstellerangaben präpariert und einer Random-Sequenzierung mittels der Kettenabbruch-Methode unter Einsatz des ABI PRISM Big Dye Termination Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Germany) unterzogen. Auswertung und Annotation der EST-Sequenzen zwischen 100 und 500 Basenpaaren ergab eine EST-Datenbank mit nicht-redundanten Sequenzen. In dieser Datenbank konnten erfolgreich neue Desaturase-Sequenzen aus *M. squamata* identifiziert werden.

15

20

25

- 98 -

5 μ l von aus *M. squamata* isolierter Gesamt-RNA wurde transkribiert und an Adapter-ligierte doppelsträngige cDNA (ds-cDNA) unter Verwendung des Marathon cDNA amplification kit (BD Bioscience) nach den Angaben des Herstellers ligiert. Die Adapter-ligierte ds-cDNA wurde mit sterilem dd H₂O verdünnt (1:250) und als Template für 5'- und 3'-RACE PCR-Reaktionen eingesetzt, um die fehlenden 5'-prime- und 3'-prime-Enden der kodierenden Sequenzen für verschiedene Desaturasen zu erhalten. Für die RACE-Reaktionen wurden ein Marathon cDNA-Adapterprimer 1 (AP1) und ein Gen-spezifischer Primer anhand der EST-Sequenzinformationen designt. Die in 5'- und 3'-RACE-Reaktionen eingesetzten Primer sahen wie folgt aus: für Ms Δ 6 (MsI, Δ -6-Desaturase aus *M. squamata*) als

10 5'-RACE-Primer 5'-CATCCGGGCGGCAGCGTCATCTTCTAC-3'
und als
3'-RACE-Primer 5'-GGAGAAGAGGTGGTGGATGACCTGG-3';
für Ms Δ 5 (MsII, Δ -5-Desaturase aus *M. squamata*) als
5'-RACE-Primer 5'-CCGAGTGAGGGGAGTACGTGGCGGG-3'

15 und als
3'-RACE-Primer 5'-CACTCTCCGGCGGGCTCAACTACC-3'.

Ein 50 μ l-Standardreaktionsansatz enthielt 1 \times Ex Taq DNA Polymerase-Puffer, 1 \times Ex Taq DNA Polymerase (TaKaRa Bio), 0,2 mM von jedem dNTP, 0,5 μ M 5'-Primer oder 3'-Primer, 0,5 μ M AP1 und 5 μ l der verdünnten Adapter-ligierten ds-cDNA. Die RACE-PCR-Amplifizierung

20 wurde wie folgt durchgeführt: 30 s bei 94°C; 5 Zyklen von 5 s bei 94 °C, 3 min bei 72 °C; 5 Zyklen von 5 s bei 94 °C, 3 min bei 70 °C; 20 Zyklen von 5 s bei 94 °C, 3 min bei 68 °C. Die amplifizierten Produkte wurden aus Agarosegelen isoliert, mittels eines Kits (GE Healthcare Bioscience) gereinigt und anschließend in das Plasmid pGEM-T (Promega) kloniert.

- 99 -

Anhand der durch die RACE-PCR erhaltenen 5'- und/oder 3'-cDNA-Sequenzdaten wurden die putativen Translationsstartcodons und -stopcodons identifiziert, und diese Sequenzinformationen wurde verwendet, um full-length cDNA-Klone der putativen Desaturasen aus *M. squamata* zu erhalten.

5

Mittels der verfolgten EST-Sequenzierungsstrategie wurden mehr als 3500 nicht-redundante Sequenzen generiert. Die Sequenzen der beiden isolierten full length-cDNA-Klone für Desaturasen aus *M. squamata* sind in SEQ ID NO: 1 und 3 angegeben. Dabei stellt die MsI cDNA eine Δ -6-Desaturase dar, gezeigt in SEQ ID NO: 1, die als Ms Δ 6 (*M. squamata* Δ -6-Desaturase) annotiert wurde. Die Aminosäuresequenz, gezeigt in SEQ ID NO: 2 zeigt einen ORF von 450 Aminosäuren. Die MsII cDNA, gezeigt in SEQ ID NO: 3, kodiert für eine Δ -5-Desaturase, deren Aminosäuresequenz, gezeigt in SEQ ID NO: 4, einen ORF von 483 Aminosäuren aufweist. Entsprechend wurde der MsII-Klon als Ms Δ 5 (*M. squamata* Δ -5-Desaturase) annotiert.

15

Vergleicht man die Sequenzen mit bekannten Desaturasen, ergeben sich durchaus Gemeinsamkeiten, einschließlich eines N-terminalen HPGG-Motifs (Cytochrom b5-Bindungsdomäne), der drei Histidin-Boxen, die aller Wahrscheinlichkeit nach eine Rolle bei der Koordination des Diiron-Zentrums des aktiven Zentrums spielen (Shanklin and Cahoon (1998) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 611-641), und der variableren dritten Histidin-Box mit einer typischen H- nach Q-Substitution. Diese Eigenschaften sind charakteristisch für front-end-Desaturasen.

20

- 100 -

Beispiel 5: Expression der Desaturasen in Hefe

Gen-spezifische Primer wurden zu den 5'- und 3'-Enden der kodierenden Regionen der entsprechenden Nukleotidsequenzen unter Einführung von Restriktionsschnittstellen für die
5 anschließende Klonierung in die verschiedenen Hefeexpressionsvektoren designed. Für die erste Charakterisierung der Ms Δ 6 wurde der ORF (open reading frame, offener Leserahmen) von Ms Δ 6 mit den in Tabelle 1 angegebenen Primern in pYES2 kloniert. Für die weitere Charakterisierung wurden die Forward-Primer von Ms Δ 6 und Ms Δ 5 derart designt, dass die Nukleotidsequenz ACATA vor dem ATG-Startcodon enthalten war (Tabelle 1), um die
10 Translationsinitiierung in eukaryoten Zellen zu verbessern. Die ORFs von Ms Δ 6 und Ms Δ 5 wurden mittels PCR mit den beschriebenen Primern (siehe Tabelle 1) unter Einsatz des Expand High Fidelity^{plus} PCR Systems (Roche Diagnostics), von cDNA als Template und einem Standard-PCR-Protocol (2 min bei 94 °C, 10 Zyklen von 10 s bei 94 °C, 30 s bei 70 °C, 80 s bei 72 °C, gefolgt von 20 Zyklen von 10 s bei 94 °C und 3 min bei 72 °C, und einem abschließenden
15 Elongationsschritt von 7 min bei 72 °C) modifiziert. Die amplifizierten cDNAs wurden in den pGEM-T-Vektor (Promega) kloniert, bevor sie wieder herausgeschnitten und in einen Hefeexpressionsvektor (pYES2, Invitrogen, pESC-LEU oder pESC-TRP, Stratagene) kloniert wurden, was in den Vektoren pYES2-Ms Δ 6, pESC-LEU-Ms Δ 6 und pESC-TRP-Ms Δ 5 resultierte.

20

Für Co-Expressionsexperimente wurde die Δ 6-Elongase aus *Physcomitrella patens*, PSE1 (Zank et al. (2002) Plant J. 31: 255-268) in den Hefeexpressionsvektor pESC-LEU kloniert, um den Vektor pESC-LEU-PSE1-Ms Δ 6 zu erhalten, bevor der ORF von Ms Δ 6 wie oben erläutert inseriert wurde.

25

- 101 -

Zum Zwecke des Vergleichs mit den bekannten Desaturasen aus *Phaeodactylum tricornutum*, PtΔ6 and PtΔ5, wurden die *P. tricornutum* cDNA-Klone in Hefeexpressionsvektoren wie oben für die *M. squamata*-Desaturasen beschrieben kloniert, wodurch pESC-LEU-PSE1-PtΔ6 und pESC-TRP-PtΔ5 erhalten wurden. Sämtliche Primer für full length-cDNAs und die

5 Hefeexpressionskonstrukte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

S. cerevisiae-Zellen vom Stamm INVSc1 von Invitrogen (Karlsruhe, Germany) wurden nach der Methode von Dohmen et al. (Dohmen et al. (1991) Yeast 7: 691-692) transformiert. Zum Zwecke der Induktion wurden Expressionskulturen für 72 h bei 21 - 23 °C in Gegenwart von 2 % (w/v)

10 Galactose, ergänzt mit 350 µM eines geeigneten Fettsäuresubstrats und in Gegenwart von 1 % Igepal CA 630 ('NP 40') von Sigma-Aldrich angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 1200 g für 5 min geerntet und die Pellets zweimal mit sterilem dd H₂O gewaschen, bevor sie für weitere Analysen eingesetzt wurden. Der mit dem leeren Vektor bzw. den leeren Vektoren transformierte Wirtstamm wurde in sämtlichen Experimenten als Negativkontrolle verwendet.

15

Beispiel 6: Fettsäureanalyse

Fettsäuremethylester (FAMES) wurden durch Transmethylierung der Hefezellsedimente mit 0,5 M Schwefelsäure in Methanol enthaltend 2 % (v/v) Dimethoxypropan bei 80 °C für 1 h erhalten.

20 FAMES wurden in Hexan extrahiert und durch Gas-Chromatographie (GC) analysiert. Die GC-Analyse wurde mit einem Agilent GC 6890-System, gekoppelt mit einem FID-Detektor ausgestattet mit einer 122-2332 DB-23-Kapillarsäule (30 m x 0,32 mm; 0,5 µm Beschichtungsdicke; Agilent) durchgeführt. Helium wurde als Trägergas (1 ml min⁻¹) verwendet. Proben wurden bei 220 °C injiziert. Der Temperaturgradient war wie folgt: 150 °C für 1 min, 150 °C -

25 200°C bei 15 °C min⁻¹, 200 °C – 250 °C bei 2 °C min⁻¹, und 250 °C für 10 min. Die Daten wurden

- 102 -

mittels HP ChemStation Rev. A09.03 ausgewertet. FAMES wurden durch Vergleich mit geeigneten Referenzsubstanzen von FAMES identifiziert.

Um die Substrat- und Regiospezifität der putativen Desaturasen zu bestätigen, waren die full
5 length-cDNAs von MsΔ6 und MsΔ5 in pYES2, pESC-LEU and pESC-TRP kloniert worden. In diesen Vektoren stehen die Desaturase-Sequenzen unter Kontrolle des Galaktose-induzierbaren Promotors GAL1 bzw. GAL10. Die erhaltenen Plasmide wurden mit MsΔ6-pYES2, MsΔ6-pESC-LEU und MsΔ5-pESC-TRP bezeichnet. Die Klone wurden einzeln im *S. cerevisiae*-Stamm INVSc1 exprimiert. Beide Transformanten wurden in Gegenwart potentieller Fettsäuresubstrate für Δ-6- und Δ-5-Desaturasen inkubiert, nämlich jeweils 18:2^{Δ9,12}, 18:3^{Δ9,12,15},
10 20:3^{Δ8,11,14} und 20:4^{Δ8,11,14,17}. Bei Fütterung von α-Linolensäure (18:3^{Δ9,12,15}) produzierten die Hefezellen, die den ORF von MsΔ6 exprimierten, eine neue Fettsäure. Mittels GC-MS-Analyse (Christie (1998) vide supra) konnte diese neue Fettsäure als Stearidonsäure (18:4^{Δ6,9,12,15}) identifiziert werden, wodurch gezeigt war, dass die MsΔ6-cDNA für eine Δ-6-Fettsäuredesaturase
15 kodiert. Die entsprechenden Fütterungsexperimente sind in Figur 2 gezeigt.

Die Expression von MsΔ5 unter Fütterung von Dihomo-γ-linolensäure (20:3^{Δ8,11,14}) und ω3-Arachidonsäure (20:4^{Δ8,11,14,17}) führte ebenfalls zu neuen Fettsäureprodukten, die Arachidonsäure (ARA, 20:4^{Δ5,8,11,14}) bzw. Eicosapentaensäure (EPA, 20:5^{Δ5,8,11,14,17}) entsprachen. Die Struktur
20 wurde mittels GC-MS-Analyse bestätigt, wodurch gezeigt war, dass MsΔ5 eine Δ-5-Desaturase ist. Die entsprechenden Fütterungsexperimente sind in Figur 3 gezeigt.

Das MsΔ6-Enzym zeigte eine sehr hohe Spezifität, nur die gefütterte α-Linolensäure wurde als Substrat verwendet und in Stearidonsäure mit 17 % Desaturierungseffizienz (pYES2-MsΔ6) und
25 35 % Desaturierungseffizienz (pESC-LEU-MsΔ6, welches die Translationsinitiierungssequenz

ACATA aufweist) umgewandelt (Figur 4A). Ms Δ 5 scheint dagegen weniger spezifisch zu sein und setzt sowohl 20:3 ^{Δ 8,11,14} als auch 20:4 ^{Δ 8,11,14,17} als Substrat für die Desaturierung um. Die Desaturierungseffizienz von Ms Δ 5 mit 20:4 ^{Δ 8,11,14,17} als Substrat war vergleichbar mit der mit 20:3 ^{Δ 8,11,14} (9 % bzw. 7 % Umwandlung), wie aus Figur 4B ersichtlich ist.

5

Beispiel 7: Lipidanalyse

Für die Lipidanalysen erfolgte die Expression in 120 ml-Kulturen. Geerntete Zellpellets wurden in 5 ml Chloroform/Methanol (1:2) homogenisiert und die Lipide auf einem Schüttler für 4 h und anschließend für 20 h mit 5 ml Chloroform/Methanol (2:1) bei 4 °C extrahiert. Die erhaltenen organischen Phasen wurden vereint und unter Stickstoff verdampft. Die verbleibenden Lipide wurden in 1 ml Chloroform gelöst. Die Auftrennung der Lipidklassen (neutrale Lipide und Phospholipide) wurde unter Verwendung einer Kieselgel-Säule (Bond Elut SI, 100 mg/ml; Varian, Darmstadt) erreicht. Die Lipidextrakte wurden auf die Kieselgel-Säule geladen, die zuvor mit Chloroform vorequilibriumiert worden war, und dann in die Lipidklassen durch Elution wie folgt fraktioniert: neutrale Fette mit Chloroform und Phospholipide mit Methanol/Eisessig (9:1). Die Isolierung der einzelnen Komponenten aus der Phospholipid-Klasse wurde mittels Dünnschicht-Chromatographie (thin-layer-chromatography, TLC) mit Methanol/Chloroform/Eisessig (65:25:8) als Laufmittel und mit geeigneten Standards erreicht.

15
20

Ein Vergleich der isolierten Desaturasen mit bekannten Desaturasen ließ eine Acyl-CoA-abhängige Fettsäuredesaturierung in *M. squamata* vermuten. Die Verteilung der produzierten Fettsäuren in Lipidklassen kann ein Hinweis auf eine Acyl-CoA-spezifische Desaturierung sein. Aus diesem Grund wurden die Desaturase-exprimierenden Hefezellen mit exogener 18:3 ^{Δ 9,12,15} oder 20:3 ^{Δ 8,11,14} gefüttert und die Fettsäureverteilung in verschiedenen Lipidklassen analysiert.

25

- 104 -

Im Fall der Ms Δ 6-Expression konnte die neu gebildete 18:4 ^{Δ 6,9,12,15} in der Fraktion der neutralen Lipide und in sämtlichen Phospholipiden nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist in Figur 5 gezeigt. Die Anteile in den Phospholipiden variieren von 14 % in Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylinositol/Phosphatidylserin (PI/PS) bis 22 % der Gesamt-Lipid-assoziierten Stearidonsäure in Phosphatidylcholin (Figur 5A). Eine ähnliche Verteilung von 20:4 ^{Δ 5,8,11,14} wurde nach Expression von Ms Δ 5 in den Komponenten der einzelnen Lipidklassen gefunden. Das Desaturierungsprodukt 20:4 ^{Δ 5,8,11,14} konnte in sämtlichen Phospholipiden und in der neutralen Lipid-Fraktion nachgewiesen werden. Des weiteren wurde in den Fraktionen PC (27 %), PI/PS (36 %) und neutrale Fette (29 %) eine Anreicherung von Arachidonsäure in gleichen Mengen beobachtet, wie in Figur 5C gezeigt, während die Anreicherung in der Fraktion PE mit 8 % geringer war.

Die separate Expression der beiden Desaturasen, Ms Δ 6 und Ms Δ 5, wie in Figur 5 dargestellt, zeigt, dass die Desaturierungsprodukte der beiden Desaturasen in der Fraktion PC nicht sonderlich stark angereichert sind, sondern vielmehr in relativ hohen Anteilen in sämtlichen der verschiedenen analysierten Lipidspecies nachgewiesen werden konnten. Diese Beobachtung spricht dafür, dass Ms Δ 6 und Ms Δ 5 Acyl-CoA-Thioester eher als Substrate akzeptieren als Lipid-gebundene Acyl-Gruppen, wie es für die Acyl-CoA-spezifische Δ -6-Desaturase aus *O. tauri* beobachtet wurde.

Der Vermutung einer Acyl-CoA-spezifischen Desaturierung durch die isolierten Desaturasen aus *M. squamata* wurde in Co-Expressionsexperimenten weiter nachgegangen. Dabei wurden beide Enzyme Ms Δ 6 und Ms Δ 5 zusammen mit der Acyl-CoA-abhängigen Δ -6-Elongase aus *P. patens*, PSE1 (Zank et al. (2002) vide supra) in Hefe exprimiert. Bei Fütterung von 18:3 ^{Δ 9,12,15} als exogenes Substrat zeigte sich eine effiziente Biosynthese von Eicosapentaensäure (EPA), siehe

- 105 -

Figur 6B, wobei EPA zu ungefähr 0,7 % der Gesamt-Fettsäuren akkumulierte (Figur 7). Die Akkumulation von EPA war bei Expression von MsΔ6 und MsΔ5 somit etwa 3-fach höher als bei Expression der entsprechenden Lipid-abhängigen Desaturasen aus *P. tricornutum* (Figur 7), was auch von Domergue et al., 2002 (Eur. J. Biochem. 269: 4105-4113) berichtet wurde. Die höheren Produktionsraten von EPA bei Co-Expression der Desaturasen aus *M. squamata* und der *P. patens* Δ-6-Elongase resultierten aus der effizienten Δ6-Desaturierung des 18:3^{Δ9,12,15}-Substrats (16 % Umwandlung) durch MsΔ6, der effizienten Elongation (97 % Umwandlung) des Δ 6-Desaturierungsprodukts 18:4^{Δ6,9,12,15} zu der entsprechenden C20-Fettsäure sowie der effizienten Δ 5-Desaturierung (20 % Umwandlung).

10

Bei Verwendung Lipid-abhängiger Desaturasen in Kombination mit einer CoA-spezifischen Elongase war die EPA-Akkumulation nicht so signifikant, da die Fettsäureintermediate wegen des zusätzlichen Transacylierungsschritts, der erforderlich ist, um Intermediate zwischen dem PC-Pool und dem Acyl-CoA-Pool hin und her zu bewegen, vermutlich den betroffenen Enzymen weniger effizient dargeboten werden. Das indikative Fettsäureintermediat 18:4^{Δ6,9,12,15} akkumulierte in höherem Ausmaß als bei Expression der *M. squamata*-Enzyme beobachtet werden konnte, was für eine weniger effiziente Umwandlung für die Δ-6-Desaturierung (6 % Umwandlung), die Δ-6-Elongation (61 % Umwandlung) und in Folge geringere Δ-5-Desaturierung (14 % Umwandlung) spricht.

20

Die Anwesenheit von 20:3^{Δ11,14,17} und 20:4^{Δ5,11,14,17} in beiden Profilen ging auf die Elongation von 18:3^{Δ9,12,15} durch PSE1 und nachfolgende Desaturierung durch MsΔ5 zurück. Diese Nebenprodukte der Δ-6-Elongationsreaktion waren unerwartet und akkumulierten nur aus dem Grund, dass eine große Menge an 18:3^{Δ9,12,15} gefüttert worden war. Die Synthese von 20:4^{Δ5,11,14,17} zeigt das breite Substratspektrum des MsΔ5-Enzyms.

25

- 106 -

Beispiel 8: Klonierung in Pflanzenexpressionsvektoren und Erzeugung transgener Pflanzen und Fettsäureanalyse der transgenen Pflanzen

Zur Herstellung langkettiger, mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Pflanzen werden die im
5 erfindungsgmäßigen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für eine Δ -6-Desaturase-
und eine Δ -5-Desaturase-Aktivität codieren, werden in einer Expressionskassette allein oder
bevorzugt in Kombination mit anderen Nukleinsäuresequenzen, die für eine Δ -6-Elongase, eine
 Δ -5-Elongase, eine Δ -4-Desaturase, eine ω -3-Desaturase, eine Δ -12-Desaturase, eine Δ -15-
Desaturase, eine bifunktionale Δ -12- und Δ -15-Desaturase, eine Lysophospholipid-
10 Acyltransferase, eine Diacylglycerol-Acyltransferase oder eine Phospholipid-Diacylglycerol-
Acyltransferase codieren, in eine geeignete Pflanze eingebracht und dort exprimiert. Es kann im
Nukleinsäurekonstrukt mehr als eine Nukleinsäuresequenz einer enzymatischen Aktivität wie
z.B. einer Δ -6-Desaturase, Δ -5-Desaturase, Δ -6-Elongase, Δ -5-Elongase, Δ -4-Desaturase, ω -3-
Desaturase, Δ -12-Desaturase, Δ -15-Desaturase, bifunktionalen Δ -12- und Δ -15-Desaturase,
15 Lysophospholipid-Acyltransferase, Diacylglycerol-Acyltransferase und/oder Phospholipid-
Diacylglycerol-Acyltransferase enthalten sein. Zur Expression der in dieser Erfindung genannten
Nukleinsäuresequenzen in Pflanzen wie Brassica-Arten wie Raps, Sonnenblume, Sojabohne,
Linum-Arten wie Öllein, Mais, Roggen, Weizen, Hafer, Crambe, Triticale, Reis, Gertse,
Kartoffel, Ackerbohne-Arten wie *Vicia faba*, Erbse, Ölpalme, Kokosnuss, Erdnuss, Borretsch
20 werden Promotoren eingesetzt, die in Pflanzenzellen aktiv sind und die Expression der
Nukleinsäuresequenz(en) in Pflanzenzellen gewährleisten. Hierbei handelt es sich bevorzugt um
Promotoren mit konstitutiver und/oder samenspezifischer und/oder gewebespezifischer Aktivität.
Zum Einbringen der Nukleinsäuren bzw. Nukleinsäurekonstrukte werden die im Rahmen dieser
Erfindung eingesetzten Nukleinsäuren bevorzugt einer Amplifikation und einer Ligation mittels
25 Polymerasekettenreaktion (beispielsweise in Anlehnung an das Protokoll der Pfu-DNA-

- 107 -

Polymerase oder Taq-Polymerase) bzw. T4-DNA Ligase oder anderer DNA-ligierender Enzyme unterzogen. Die Primer sollten so gewählt werden, dass die Amplifikation des gesamten codierenden Bereichs der in diesem Verfahren beschriebenen Nukleinsäuren erlaubt ist. Die Nukleinsäuren können dann in für die Expression in Mikroorganismen oder Pflanzenzellen geeignete Vektorsysteme eingebracht werden. Hierzu gehören insbesondere Vektoren, die in mikrobiellen Systemen replizierbar sind und vor allem Vektoren, die eine effiziente Klonierung in Hefen, Mikroorganismen oder Pilzen gewährleisten, und die stabile Transformation von Pflanzen, wie z.B. mittels Agrobacterium vermittelte Transformation. Geeignete Transformationsmethoden für Pflanzen sind dem Fachman bekannt und beruhen auf T-DNA vermittelte Transformation geeignete binäre und co-integrierte Vektorsysteme. Die Vektorsysteme umfassen weitere cis-regulatorische Elemente und Selektionsmarker. Die Transformation der Pflanzen wird in Anlehnung an Standardprotokolle und die Selektion der Transformanten wird mittels des Selektionsmarkers erlaubt.

15 Die Fettsäureanalyse der transgenen Pflanzen erfolgt geeigneterweise in Form einer Fettsäureanalyse der transgenen Samen, z.B. transgenen Raps-Samen (*Brassica napus*). Dabei kann folgenden Protokoll einer Einzelsamenanalyse durchgeführt werden:

Transgene Einzelsamen werden mit Hilfe einer Nadel aufgebrochen und die Fettsäuren durch die Zugabe von 10 µl TMSH (Macherey-Nagel) derivatisiert. Nach Abdampfen des TMSH werden die Einzelsamen-Proben in 5 µl Acetonitril aufgenommen. Die Fettsäurebestimmung erfolgt über GC-Analyse (siehe Beispiel 6 "Fettsäureanalyse").

Beispiel 9: Acyl-CoA-Spezies, Synthese, Extraktion und Analyse

Authentische Standards für gesättigte und einfach ungesättigte Acyl-CoA-Ester mit Acyl-Kettenlängen von C12 bis C18 wurden von Sigma bezogen. Standards für mehrfach ungesättigte Acyl-CoAs (18:3^{Δ9,12,15}, 18:4^{Δ6,9,12,15}, 20:3^{Δ8,11,14}, 20:4^{Δ8,11,14,17} und 20:5^{Δ5,8,11,14,17}) wurden enzymatisch unter Verwendung einer rekombinanten Acyl-CoA-Synthetase aus *Pseudomonas* sp. (Sigma) synthetisiert. Das Reaktionsgemisch (200 µl), enthaltend 100 mM Tris-HCl, pH 8,1, 10 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM CoASH, 2 mM DTT, 25 µM freie Fettsäure, und 2,5 Einheiten der Acyl-CoA-Synthetase wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl von Eisessig/Ethanol 1:1 (v/v) gestoppt, die gewünschten wässrigen Phasen wurden mit Benzin gewaschen, um restliche freie Fettsäuren zu entfernen. Nach der Aufreinigung der Acyl-CoA-Spezies an einer Seppak-Säule (Strata C18-E; Phenomenex) unter Verwendung von Acetonitril als Elutionsmittel wurden die Proben unter Argon getrocknet und in 50 mM Mes, pH 5,0 aufgelöst.

15

Zur Acyl-CoA-Analyse von Hefezellen wurden 20 ml der Flüssigkulturen bei einer OD₆₀₀ von 1,5 bis 2,0 geerntet und die Acyl-CoA-Spezies wurden extrahiert wie beschrieben in Domergue et al. (2005) *Biochem. J.* 389(2): 483-490. Die Umwandlung der Acyl-CoA-Ester in ihre Etheno-Derivate und die Acyl-CoA-Analyse wurden durchgeführt wie beschrieben von Larson and Graham (2001) *Plant J.* 25(1): 115-125.

20

25

Beispiel 10: Verteilung der Ms Δ 6- und Ms Δ 5-Desaturierungsprodukte in verschiedenen Lipidklassen in Hefe

Da die Verteilung der Produktfettsäuren in verschiedenen Lipidklassen als ein Indikator für die Desaturierung im Acyl-CoA-Pool dienen kann, wurden Hefekulturen, die Ms Δ 6 und Ms Δ 5 exprimieren, mit exogenem 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$ bzw. 20:3 $^{\Delta 8,11,14}$ versetzt und die Fettsäureverteilung in den einzelnen Lipidklassen wurde analysiert. Parallel dazu wurden die gleichen Experimente mit der Acyl-CoA-abhängigen Ot Δ 6- und der Lipid-abhängigen Pt Δ 6- und Pt Δ 5-Desaturase durchgeführt. Bei allen getesteten Δ 6-Desaturasen wurde 18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$, das durch Δ 6-Desaturierung des 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$ -Substrats produziert wurde, vorherrschend in der neutralen Lipidfraktion und in PC detektiert und zu einem geringeren Grad in den anderen analysierten Phospholipiden (Abb. 8A). Wie für eine Lipid-abhängige Desaturase erwartet wurde, resultierte die Expression von Pt Δ 6 in der Akkumulierung des 18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$ -Produkts vor allem in Phosphatidylcholin (PC), wogegen 18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$ bei der Expression der CoA-abhängigen Ot Δ 6 zwischen neutralen Lipiden und PC in etwa gleich verteilt war. Die Expression von Ms Δ 6 resultierte sogar in einer verstärkten Akkumulation von 18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$ in neutralen Lipiden gegenüber PC, was zeigt, dass die Ms Δ 6-Desaturierung nicht Lipid-abhängig ist. Das 18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$ -Produkt war in allen Δ 6-Desaturase-Expressionskulturen in Phosphatidylinositol mit Phosphatidylserin (PI/PS), Phosphatidylethanolamin (PE) und Diphosphatidylglycerin (CL) in etwa gleich verteilt.

Wenn die Δ 5-Desaturasen hinsichtlich der Verteilung des Desaturierungsprodukts 20:4 $^{\Delta 5,8,11,14}$ in den Lipidklassen getestet wurden, wurde das Produkt in der neutralen Lipidfraktion und in allen analysierten Phospholipiden nachgewiesen (Abb. 8 B). Wenn Ms Δ 5 exprimiert wurde, akkumulierte 20:4 $^{\Delta 5,8,11,14}$ ungefähr gleichmäßig in PC, PI/PS, PE, CL und in der neutralen

- 110 -

Lipidfraktion wie in Abb. 8 B gezeigt. Im Gegensatz dazu akkumulierte $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$, das durch die Expression von Pt $\Delta 5$ gebildet wurde, vor allem in PC und wurde nur in geringen Mengen in PI/PS (10%), PE (5%) oder DPG (6%) nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für die Lipid-spezifischen Desaturasen (wie hier zum Beispiel Pt $\Delta 5$), bei denen die

5 Desaturierungsprodukte vor allem in PC angereichert sind (Domergue et al. (2003) J. Biol. Chem. 278: 35115-35126), zeigen die Daten, dass Fettsäuren, die durch Ms $\Delta 6$ und Ms $\Delta 5$ produziert werden, nicht vorrangig mit PC assoziieren und in ungefähr gleichen Mengen in allen analysierten Lipid-Spezies detektiert werden können. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Ms $\Delta 6$ und Ms $\Delta 5$ Acyl-CoA-Thioester anstelle von Lipid-gebundenen Acylgruppen als Substrate

10 verwenden.

Bei dem Vergleich der Ot $\Delta 6$ mit der neuen Ms $\Delta 6$ stellte sich heraus, dass die letzt genannte Desaturase hoch spezifisch für die ω -3-Fettsäure $18:3^{\Delta 9,12,15}$ ist, während Ot $\Delta 6$ auch die Fettsäure $18:2^{\Delta 9,12}$ umsetzt (Abb. 9).

15 Beispiel 11: Nachweis der Desaturierungsprodukte von Ms $\Delta 6$ und Ms $\Delta 5$ im Acyl-CoA-Pool

Zur direkten Bestätigung der Acyl-CoA-Abhängigkeit von Ms $\Delta 6$ und Ms $\Delta 5$ wurden die Acyl-CoA-Profile für die jeweiligen Hefe-Expressionskulturen bestimmt. Kontrollkulturen, die Ot $\Delta 6$, Pt $\Delta 6$ oder Pt $\Delta 5$ exprimieren, wurden parallel dazu getestet. Die dargestellten Daten wurden erhalten durch das Verfahren, das bei Domergue et al. (2005) Biochem. J. 389(2): 483-490 beschrieben ist. Exogene Substrate ($18:3^{\Delta 9,12,15}$ für $\Delta 6$ -Desaturasen oder $20:3^{\Delta 8,11,14}$ für $\Delta 5$ -Desaturasen) wurden bei einer optischen Dichte von 1,5 bis 2,0 zu den induzierten Hefekulturen zugegeben. Innerhalb von fünf Minuten nach Zugabe von exogenem $18:3^{\Delta 9,12,15}$ -Substrat zu den

20 Kulturen, die Ms $\Delta 6$, Ot $\Delta 6$ oder Pt $\Delta 6$ exprimierten, wurde $18:3^{\Delta 9,12,15}$ als neuer Peak in den

25

- 111 -

Gesamtfettsäure-Pools und im Acyl-CoA-Pool der jeweiligen Kulturen detektiert (Abb. 10 A). Zusätzlich tauchte ein zweiter neuer Peak entsprechend $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$, dem Produkt der $\Delta 6$ -Desaturierung, gleichzeitig im Acyl-CoA-Pool der Hefe, die Ms $\Delta 6$ und Ot $\Delta 6$ exprimierten, aber nicht in dem Acyl-CoA-Pool der Hefe, die Pt $\Delta 6$ exprimierten, auf (Abb. 10 A). Das $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ -
5 Produkt war zu diesem frühen Zeitpunkt in keiner der Kulturen im Gesamtfettsäure-Pool detektierbar und $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ tauchte in den Gesamtfettsäure-Profilen der Kulturen, die Ms $\Delta 6$, Ot $\Delta 6$ bzw. Pt $\Delta 6$ exprimierten, erst zu Zeitpunkten nach einer Stunde nach Zugabe von $18:3^{\Delta 9,12,15}$ auf. Nach einer Stunde tauchten Spuren von $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ auch im Acyl-CoA-Pool der Hefe, die Pt $\Delta 6$ exprimierten, auf (Daten nicht gezeigt). Das Auftreten des $\Delta 6$ -Desaturase-Produkts im Acyl-
10 CoA-Pool vor dem Auftreten im Gesamtfettsäure-Pool lässt darauf schließen, dass Ms $\Delta 6$ $18:3^{\Delta 9,12,15}$ zu $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ in einer Acyl-CoA-abhängigen Weise desaturiert, was mit den Daten für Ot $\Delta 6$ übereinstimmt, die von Domergue et al. (2005) Biochem. J. 389(2): 483-490 veröffentlicht wurden. Umgekehrt weist das verzögerte Auftreten des $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ -Produkts im Acyl-CoA-Pool bei der Expression von Pt $\Delta 6$ darauf hin, dass die Desaturierung durch Pt $\Delta 6$ an
15 Fettsäuren auftritt, die an Phospholipide gebunden sind, und nicht an denen, die mit CoA assoziiert sind.

Veränderungen in den Gesamtfettsäuren und dem Acyl-CoA-Pool bei der Expression der $\Delta 5$ -Desaturasen Ms $\Delta 5$ und Pt $\Delta 5$ wurden unmittelbar vor der Zugabe von exogenem $20:3^{\Delta 8,11,14}$ -
20 Substrat und dann nach 1, 4, 8 und 24 h analysiert, da diese Desaturasen nicht so effizient wie die $\Delta 6$ -Desaturasen waren und die $\Delta 5$ -Desaturierungsprodukte nur zu diesen späteren Zeitpunkten nachweisbar waren. Innerhalb von 1 h nach Zugabe von exogenem $20:3^{\Delta 8,11,14}$ -Substrat zu Kulturen, die Ms $\Delta 5$ oder Pt $\Delta 5$ exprimierten, wurde $20:3^{\Delta 8,11,14}$ als neuer Peak in den Gesamtfettsäure-Pools und in den Acyl-CoA-Pools aller Kulturen nachgewiesen. Nach 4h
25 erschien ein zweiter neuer Peak, der dem $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ -Produkt der $\Delta 5$ -Desaturierung entspricht,

- 112 -

im Gesamtfettsäure-Pool der Hefe, die Pt Δ 5 exprimiert, aber nicht in dem der Hefe, die Ms Δ 5 exprimiert (Abb. 10B). In Ms Δ 5-Kulturen war das 20:4 ^{Δ 5,8,11,14}-Produkt bis acht Stunden nach Substratzugabe nicht nachweisbar, als 20:4 ^{Δ 5,8,11,14} im Acyl-CoA-Pool erschien, aber war im Gesamtfettsäure-Pool immer noch nicht nachweisbar (Abb. 10 B). Nur zu Zeitpunkten, die über
5 acht Stunden nach Zugabe von 20:3 ^{Δ 8,11,14} hinausgingen, waren Spuren von 20:4 ^{Δ 5,8,11,14} im Gesamtfettsäure-Pool der Hefe, die Ms Δ 5 exprimiert, nachweisbar (Abb. 10B).

Beispiel 12: Verlängerung der Desaturierungsprodukte von Ms Δ 6 und Ms Δ 5

10 Um einen weiteren Beweis dafür zu liefern, dass Ms Δ 6 und Ms Δ 5 Acyl-CoA-abhängige Desaturasen sind, wurden die Desaturasen einzeln mit Acyl-CoA-Elongasen koexprimiert. Der Hintergrund dieses Experiments ist, dass die Fettsäureverlängerung im Acyl-CoA-Pool stattfindet (Domergue et al. (2003) J. Biol. Chem. 278: 35115-35126) und dass Fettsäuren, die im Acyl-CoA-Pool desaturiert wurden, effizienter verlängert werden als solche, die durch Lipid-abhängige
15 Enzyme desaturiert wurden und dadurch zusätzliche Acyl-Transferase-Aktivitäten erfordern. Die Effizienz der kombinierten Desaturierungen/Verlängerungen wurde im gleichen Zusammenhang verglichen mit der, die aus der Expression der bekannten Desaturasen Ot Δ 6, Pt Δ 6 oder Pt Δ 5 resultierte.

20 Die Δ 6-Desaturasen wurden einzeln in Hefe mit der Δ 6-Elongase PSE1 aus dem Moos *Physcomitrella patens* (Zank et al. (2002) Plant J. 31: 255-268; Abb. 11 A) koexprimiert. Im Falle von Ms Δ 6 und Ot Δ 6 war das Desaturierungsprodukt 18:4 ^{Δ 6,9,12,15} kaum nachweisbar und wurde zu nahezu 100% zum Endprodukt der Elongation, 20:4 ^{Δ 8,11,14,17}, verlängert. Das
zusätzliche Elongationsprodukt, 20:3 ^{Δ 11,14,17}, entspricht der zugefütterten Fettsäure, 18:3 ^{Δ 9,12,15},
25 und zeigt, dass Δ 9-desaturierte Fettsäuren auch als Substrate für PSE1 dienen, wie schon

- 113 -

beschrieben (Zank et al. (2002) Plant J. 31: 255-268). Im Unterschied zur Situation mit Ms Δ 6 resultierte die Expression von Pt Δ 6 in der Akkumulation des Δ 6-Desaturierungsprodukts 18:4 ^{Δ 6,9,12,15} und ein geringerer Teil (ca. 60%) des 18:4 ^{Δ 6,9,12,15} wurde zu 20:4 ^{Δ 8,11,14,17} verlängert. Exogen zugegebenes 18:3 ^{Δ 9,12,15} wurde besser und mit höherer Effizienz durch PSE1 elongiert als
5 das Desaturierungsprodukt von Pt Δ 6, was konsistent ist mit der Aktivierung von exogen zugegebenen Fettsäuren zu Acyl-CoA-Formen.

Die Δ 5-Desaturasen Ms Δ 5 und Pt Δ 5 wurden in Hefe mit der OtELO5 Δ 5-Elongase aus *O. tauri* koexprimiert (Meyer et al. (2004) J Lipid Res. 45(10):1899-1909). Den Expressionskulturen
10 wurde 20:4 ^{Δ 8,11,14,17}, das ω 3-Substrat der Δ 5-Desaturasen, zugesetzt, da die *O. tauri* Δ 5-Elongase ω 3-Fettsäure-Substrate gegenüber ω 6-Substraten bevorzugt (Meyer et al. (2004) J Lipid Res. 45(10):1899-1909). Wie in Abb. 11 B gezeigt, wurde das Desaturierungsprodukt von Ms Δ 5, 20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17} (EPA), fast vollständig zu 22:5 ^{Δ 7,10,13,16,19} verlängert (Verlängerung ca 90%), wogegen die Lipid-abhängige Desaturase Pt Δ 5 zu einer Akkumulierung der Lipid-gebundenen
15 Desaturierungs-Intermediate (hier 20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17} (EPA)) führte (Abb. 11 B) und die Elongationseffizienz gering war (ca. 24%).

Alle Daten zusammengefasst zeigen, dass sowohl Ms Δ 6 als auch Ms Δ 5 Acyl-CoA-abhängige Fettsäure-Desaturasen sind.

20

Beispiel 13: Etablierung der Acyl-CoA-abhängigen EPA-Biosynthese in *Arabidopsis thaliana*

Die Etablierung eines Acyl-CoA-abhängigen EPA Biosynthesewegs in Hefe hat gezeigt, daß es möglich ist, durch ausschließlich Acyl-CoA-spezifische Enzymaktivitäten den Engpaß des
25 Substrat-/Produkttransports zwischen CoA und Lipiden zu umgehen und die bei der Lipid-

- 114 -

abhängigen Desaturierung zusätzlich benötigten enzymatischen Aktivitäten der Acyl-CoA:Lysophosphatidylcholineacyltransferasen (LPCAT) zu vermeiden. Da Hefe kein Ölakkumulierender Organismus ist und das Ausgangssubstrat der Reaktionsfolge nicht endogener Natur, sondern in hohen Mengen dem Expressionssystem Hefe zugesetzt wird, dienen die bisher
5 beschriebenen Versuche als Überprüfung des Gesamtkonzepts für den neuen VLCPUFA-Biosyntheseweg.

Durch die Etablierung des Biosynthesewegs mit Acyl-CoA-abhängigen Enzymreaktionen in *Arabidopsis* sollte getestet werden, ob der beschriebene Engpaß der VLCPUFA-Biosynthese
10 (Abbadi et al. (2004) Plant Cell 16(10): 2734-2748) auch in einem pflanzlichen Organismus umgangen werden kann. Dazu wurden Vektoren für die transgene Expression der neuen Desaturaseenzyme erstellt und über Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert.

15 Für die Pflanzentransformation wurden Plasmide auf der Basis des pUC19-Vektors konstruiert. Für die Herstellung der Konstrukte wurde eine Dreifachkassette enthaltend drei samenspezifische USP-Promotorkopien (Bäumlein et al. (1991) Mol. Gen. Gen. 225(3):459-67), drei OCS-Terminatorkopien (MacDonald et al., (1991) Nucleic Acids Res. 19(20): 5575-5581) und drei
20 verschiedene Polylinker zwischen jedem Promotor und Terminator zunächst in den Vektor pUC19 (Pharmacia) eingeführt, wodurch das Plasmid USP123OCS erhalten wurde. Die offenen Leseraster der verschiedenen Desaturasen und Elongasen wurden durch PCR modifiziert, um geeignete Restriktionsschnittstellen neben den Start- und Stoppkodons zu schaffen, in den pGEM-T-Vektor kloniert (Promega) und sequenziert, um die Richtigkeit zu bestätigen. Die verwendeten Primer waren (Restriktionsschnittstellen fett gezeigt):

25

- 115 -

MsΔ6, forward 5'-ATGCGCGGCCGCACATAATGTGTCCTCCCAAGGAAT-3'
reverse 5'-GCATTCTAGACTAGTGAGCGTGCGCCTTC-3';

MsΔ5, forward 5'-ATGCCCATGGACATAATGCCCCGCGGAGACCACCAC-3'
reverse 5'-GCATACCGGTTACCCGATGGTTTGAAGGC-3';

5 PtΔ6, forward 5'-ATGCGCGGCCGCACATAATGGGCAAAGGAGGGGACGC-3'
reverse 5'-GCATTCTAGATTACATGGCGGGTCCATCGCGTA-3';

PtΔ5, forward 5'-ATGCCCATGGACATAATGGCTCCGGATGCGGATAAGC-3'
reverse 5'-GCATGCGATCGCTTACGCCCGTCCGGTCAA-3';

PSE1, forward 5'-AGTCGGATCCTATGGAGGTCGTGGAGAGAT-3'
10 reverse 5'-GACTGCTAGCTCACTCAGTTTTAGCTCCCTT -3'.

Die offenen Leseraster wurden dann unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen, die durch die PCR gebildet wurden, freigesetzt und anschließend in die gleichen Schnittstellen des Polylinkers des USP123OCS-Plasmids eingefügt. Die resultierende Kassette, enthaltend die drei
15 Gene jeweils unter der Kontrolle des USP-Promotors, wurde durch Verdau des USP123OCS-Plasmids mit *Sbf*I oder *Sac*I freigesetzt und in die entsprechenden Schnittstellen des binären Vektors pCAMBIA3300 kloniert. Der binäre Vektor pCAMBIA3300 (CAMBIA, Canberra, Australien) verwendet das *bar*-Gen zusammen mit dem CaMV-35S-Promotor als
20 Selektionsmarker in Pflanzen. Die resultierenden binären Plasmid-Konstrukte (Abb. 12) wurden in chemisch kompetente *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen transformiert (Stamm EH105).

Pflanzen des *Arabidopsis thaliana*-Ökotyps Columbia (Col-0) wurden durch florales Dipping (Clough und Bent (1998) Plant J. 16(6):735-43.) transformiert. T2-Samen wurden von einzelnen, gegen Ammoniumglufosinat resistenten T1-Pflanzen gesammelt und einzeln durch GC
25 analysiert.

- 116 -

Zur Lipidanalyse wurden 10 mg Samen in 4 ml Chloroform/Methanol/Eisessig (2:1:0,1 v/v/v) homogenisiert und für 24 h bei 4°C inkubiert. Samenreste wurden pelletiert (2 Min., 3000 x g). Der Überstand wurde gesammelt und die pelletierten Samenreste wurden mit 2 ml *n*-Hexan für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die resultierenden organischen Phasen wurden vereint und unter Stickstoff getrocknet. Die getrockneten Lipide wurden in 200 µl Chloroform gelöst. Die Trennung der Lipidklassen (TAG und verschiedene Phospholipide) wurde erreicht durch Dünnschichtchromatographie (DC) mit Methanol/Chloroform/Eisessig (65:25:8) als Laufmittel. Die Lipide (TAG, PC, PI/PS und PE) wurden nach authentischen Standards (xy) identifiziert, aus den DC-Platten ausgekratzt und zur nachfolgenden Fettsäureanalyse mit dem Laufmittel reextrahiert.

Fettsäuremethylester (FAMES) von einzelnen oder gepoolten *Arabidopsis*-Samen wurden hergestellt durch Transesterifizierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) (Butte et al. (1982) Anal. Lett. 15: 841–850). FAMES von DC-getrennten einzelnen Lipiden wurden durch Transmethylierung mit 333 µl Toluol/Methanol (1:2 v/v) und 167 µl 0,5 M NaOCH₃ bei Raumtemperatur für 20 Min. erhalten. FAMES wurden in 500 µl NaCl, 50 µl HCl (37%) und 2 ml *n*-Hexan extrahiert, unter Stickstoff getrocknet und durch GC analysiert. Die GC-Analyse wurde durchgeführt mit einem Agilent GC 6890-System, das mit einem FID-Detektor gekoppelt ist, der mit einer kapillaren 122-2332 DB-23-Säule ausgestattet ist (30 m x 0,32 mm; 0,5 µm Beschichtungsdicke; Agilent). Als Trägergas wurde Helium verwendet (1 ml Min.⁻¹). Die Proben wurden bei 220°C injiziert. Der Temperaturgradient betrug 150°C für 1 Min., 150°C - 200°C bei 15°C Min.⁻¹, 200°C - 250°C bei 2°C Min.⁻¹, und 250°C für 10 Min. Die Daten wurden unter Verwendung der HP ChemStation Rev. A09.03 verarbeitet. FAMES wurden nach geeigneten Standards identifiziert.

25

- 117 -

Viele höhere Pflanzen synthetisieren 18:2^{Δ9,12} und 18:3^{Δ9,12,15} in ihren Samenölen, aber bauen keine VLCPUFA mit einer Kettenlänge von mehr als 18 Kohlenstoffatomen oder mehr als drei Doppelbindungen in TAG ein. Daher besteht ein erhebliches Interesse, die Synthese von omega-3-Fettsäuren in agronomisch interessanten Ölsamen-Spezies zu ermöglichen. Um die omega-3-Fettsäure 20:5^{Δ5,8,11,14,17} (EPA) in Samenölen zu produzieren, ist es notwendig, einen weiteren Elongations- und zwei Desaturierungsschritte einzubauen. Um die Akkumulierung von ω6-Nebenprodukten der Desaturierung zu vermeiden, sollten die ausgewählten Enzyme spezifisch für ω3-Substrate sein. Eine weitere zu vermeidende Beschränkung ist das limitierende Acyl-Ketten-Shuttling zwischen PC- und CoA-Pools, das durch Abbadi et al. (2004) Plant Cell 16(10): 2734-2748 beobachtet wurde.

Die Acyl-CoA-abhängigen Δ6- und Δ5-Desaturasen aus der Alge *M. squamata* wurden mit einer Δ6-Elongase aus dem Moos *P. patens* in *Arabidopsis*-Pflanzen koexprimiert (bezeichnet als Triple-Ms). Für eine entsprechende Kontrolle der Effizienz der Lipid-abhängigen EPA-Biosynthese, wurden die Δ6- und Δ5-Desaturasen aus der Diatomee *P. tricornutum* mit der Δ6-Elongase aus dem Moos *P. patens* in *Arabidopsis*-Pflanzen (bezeichnet als Triple-Pt) nach Abbadi et al. (2004) Plant Cell 16(10): 2734-2748 koexprimiert. Die Pflanzen-Transformationskonstrukte kodierten jedes Gen unter der Kontrolle des Samen-spezifischen USP-Promotors (Bäumlein et al. (1991) Mol Gen Genet. 225(3):459-67). Die Fettsäure-Analyse der einzelnen T2-Samen zeigte verschiedene neue Fettsäuren, die als ω3-18:4^{Δ6,9,12,15}, ω3-20:3^{Δ11,14,17}, ω3-20:4^{Δ8,11,14,17} und ω3-20:5^{Δ5,8,11,14,17} (für Triple-Ms, siehe Abbildung 13A und B) identifiziert werden konnten und für Triple-Pt zusätzlich ω6-18:3^{Δ6,9,12}, ω6-20:3^{Δ8,11,14} und ω6-20:4^{Δ5,8,11,14} (Abb. 13C). Diese Ergebnisse zeigen, dass in Triple-Ms-Pflanzen der omega-3-Weg und in Triple-Pt-Pflanzen sowohl der omega-6- als auch der omega-3-Weg erfolgreich rekonstituiert werden konnten. Unter den neuen Fettsäuren, die in den Triple-Ms *Arabidopsis*-Samen

- 118 -

produziert wurden, trat $\omega 3-20:4^{\Delta 8,11,14,17}$ am häufigsten auf. Dagegen waren in den Triple-Pt *Arabidopsis*-Samen die häufigsten Fettsäuren $\omega 6-18:3^{\Delta 6,9,12}$, $\omega 3-20:3^{\Delta 11,14,17}$ und zumindest das erste Desaturierungsprodukt im omega-3-Weg, $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$. Die Akkumulation von beiden $\Delta 6$ -desaturierten Fettsäuren in den Triple-Pt-Pflanzen stimmt mit den Ergebnissen von Abbadi et al. (2004) Plant Cell 16(10): 2734-2748 überein und bestätigt die Gegenwart eines Engpasses in der Lipid-abhängigen VLCPUFA-Biosynthese.

Im Gegensatz dazu wurde in den Triple-Ms keine Akkumulation des $\Delta 6$ -Desaturierungsprodukts $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ nachgewiesen, denn das gesamte $18:4^{\Delta 6,9,12,15}$ wurde durch die $\Delta 6$ -Elongase mit sehr hoher Effizienz (97% Umwandlung) zum entsprechenden $\omega 3-20:4^{\Delta 8,11,14,17}$ -Produkt verlängert. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Acyl-CoA- und PC-Pool-Engpass durch die Verwendung von strikt CoA-abhängiger Desaturierung erfolgreich umgangen wurde. Die geringen Anteile von $\omega 3-20:5$ (EPA) in den Triple-Ms-Pflanzen zeigen, dass die $\Delta 5$ -Desaturase-Aktivität von Ms $\Delta 5$ immer noch die Akkumulation von EPA in diesen *Arabidopsis*-Samen limitiert. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen aus den Hefe-Expressionsstudien überein, bei denen die Ms $\Delta 5$ ebenfalls nur eine geringe Desaturierungs-Effizienz zeigte.

In einem weiteren Satz von Experimenten wurden zusätzlich zu den oben erwähnten Triple-Ms- und Triple-Pt-Pflanzen auch Triple-Ot-*Arabidopsis*-Pflanzen hergestellt, die die $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturasen aus *Ostreococcus tauri* und die $\Delta 6$ -Elongase aus dem Moos *P. patens* exprimieren. Die Klonierung erfolgte wie oben für die Triple-Ms- und Triple-Pt-Vektoren beschrieben unter Verwendung der folgenden Primer:

Ot $\Delta 6$, forward 5'-ATGCGCGGCCGCACATAATGTGCGTGGAGACGGAAAAT-3'

Ot $\Delta 6$, reverse 5'-ATGCTCTAGATTACGCCGTCTTCCGGAGTGT-3'

Ot $\Delta 5$, forward 5'-ATGCCCATGGACATAATGTGGACGCCCCGCGCGCGA-3'

- 119 -

OtΔ5, reverse 5'-ATGCACCGGTTTCATCCGACGGTTTGGAGGG-3'

Die Fettsäureprofile von Einzelsamen der Triple-Ms-, Triple-Ot- und Triple-Pt-Pflanzen zeigten neue, nicht *Arabidopsis*-eigene, Fettsäuresignale, die als ω 3-18:4^{Δ6,9,12,15}, ω 3-20:4^{Δ8,11,14,17} und EPA identifiziert werden konnten (Abb. 14). Zusätzlich waren in den Triple-Ot und Triple-Pt Pflanzen auch ω 6-VLCPUFA identifizierbar, nämlich ω 6-18:3^{Δ6,9,12}, ω 6-20:3^{Δ8,11,14} und ω 6-20:4^{Δ5,8,11,14}. In den transgenen Triple-Ms Pflanzen konnte demnach der ω 3-Biosyntheseweg etabliert werden, da die Δ 6-Desaturase aus *M. squamata* spezifisch die ω 3-Fettsäure 18:3^{Δ9,12,15} desaturiert und somit keine ω 6-Fettsäuren entstehen. Dagegen konnte in den Triple-Ot und Triple-Pt Pflanzen sowohl der ω 3- als auch der ω 6-Biosyntheseweg etabliert werden, da die Δ 6-Desaturasen aus *O. tauri* und *P. tricornutum* sowohl die ω 3-Fettsäure 18:3^{Δ9,12,15} als auch die ω 6-Fettsäure 18:2^{Δ9,12} als Substrat verwenden.

Der prozentuale Anteil der endogenen Fettsäuren 18:2^{Δ9,12} und 18:3^{Δ9,12,15} sowie der neu gebildeten ω 3- und ω 6-VLCPUFA am Gesamtfettsäuregehalt der transgenen *Arabidopsis*-Samen ist in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt. Die endogenen Fettsäuren 18:2^{Δ9,12} und 18:3^{Δ9,12,15} dienten als Ausgangssubstrate der neu eingebrachten VLCPUFA-Biosynthese. Die prozentualen Anteile der beiden Fettsäuren waren in allen drei transgenen Ansätzen gleich hoch (Abb. 15 A und 16 A). Die am stärksten akkumulierenden neu gebildeten Fettsäuren in den Triple-Ms- und Triple-Ot-Pflanzen waren die Elongationsprodukte der Δ 6-Elongase, ω 3-20:4^{Δ8,11,14,17} bzw. in den Triple-Ot-Pflanzen ω 3-20:4^{Δ8,11,14,17} und ω 6-20:3^{Δ8,11,14} (Abb. 15 C und Abb. 16 C). In den Triple-Pt-Pflanzen waren hingegen die Δ 6-desaturierten Fettsäuren ω 3-18:4^{Δ6,9,12,15} und ω 6-18:3^{Δ6,9,12} am stärksten vertreten (Abb. 15B und Abb. 16B). Die Akkumulation der beiden Δ 6-desaturierten Fettsäuren in den Triple-Pt Pflanzen bestätigte die bereits in Lein-Pflanzen gemachten Beobachtungen von Abbadi et al. (2004) und belegt, daß auch in *Arabidopsis* der

- 120 -

Transfer von Fettsäuren zwischen Acyl-CoA- und Lipid-Pool durch LPCAT-Enzyme einen Engpaß der Lipid-abhängigen VLCPUFA-Biosynthese darstellt. Durch nahezu vollständige Elongation von ω 3-18:4 ^{Δ 6,9,12,15} bzw. ω 6-18:3 ^{Δ 6,9,12} zu den entsprechenden C20-VLCPUFAs in den Triple-Ms- und Triple-Ot-Pflanzen konnten im Gegensatz zu den Triple-Pt-Pflanzen keine oder nur geringe Mengen der Δ 6-Desaturase-Produkte detektiert werden (Abb. 15 B und 5 Abb. 16 B). Diese Ergebnisse demonstrieren, daß das ineffiziente Umestern der Fettsäuren zwischen dem Ort der Desaturierung (PtdCho) und dem Ort der Elongation (CoA) in der Lipid-abhängigen VLCPUFA-Synthese durch das Einbringen eines ausschließlich Acyl-CoA-abhängigen VLCPUFA-Biosyntheseweges (Triple-Ms und Triple-Ot) auch in der pflanzlichen 10 Fettsäuresynthese umgangen werden konnte.

Tabelle 1. Primer und Expressionskonstrukte, die im Rahmen der Ausführungsbeispiele verwendet wurden

| Enzym | Hefeexpressions-vektor | Primer | verwendete Restriktionsschnittstelle |
|-------|------------------------|---|--------------------------------------|
| MsΔ6 | pYES2 | 5'-GGGAATTCATGTGTCCTCCCAAGGAATCCACGAG-3' | EcoRI |
| | | 5'-GGGGGGCCGCTAGTGAGCGTGCGCCTTCCCCGTGC-3' | NotI |
| MsΔ6 | pESC-LEU | 5'-ATGCGGGCCGCACATAATGTGTCCTCCCAAGGAAT-3' | NotI |
| | | 5'-GCATAGATCTCTAGTGAGCGTGCGCCTTC-3' | BglIII |
| MsΔ5 | pESC-TRP | 5'-ATGCGGATCCACATAATGCCCCCGCGGAGACCA-3' | BamHI |
| | | 5'-GCATGCTAGCTACCCGATGTTTGAAGG-3' | NheI |
| PtΔ6 | pESC-LEU | 5'-ATGCGGGCCGCACATAATGGGCAAAGGAGGGACGC-3' | NotI |
| | | 5'-GCATTCTAGATTACATGGCGGTCCATCGCGTA-3' | BglIII |
| PtΔ5 | pESC-TRP | 5'-ATGCGGGCCGCACATAATGGCTCCGGATGCGGATA-3' | NotI |
| | | 5'-GACTTCTAGATTACGCCCCGTCCGGTCAAGGG-3' | BglIII |
| PSE1 | pESC-LEU | 5'-GGGATCCATGGAGTCTGGAGAGA-3' | BamHI |
| | | 5'-GGGCTAGCTCACTCAGTTTAGCTCCC-3' | NheI |

Erläuterungen der Figuren

Figur 1: ω 6- und ω 3-Fettsäurebiosynthese

Figur 2: Fettsäureprofil von Hefe, welche Ms Δ 6 mit der Translationsinitiations-Sequenz ACATA vor dem ATG Startkodon exprimiert.

Ms Δ 6 Aktivität in Gegenwart von 350 μ M 18:3 ^{Δ 9,12,15}. Diese Analysen reflektieren die Ergebnisse aus drei unabhängigen Expressionsexperimenten.

Figur 3: Fettsäureprofil von Hefe, welche Ms Δ 5 exprimiert.

A und C) Ms Δ 5-Aktivität in Gegenwart von jeweils 350 μ M 20:3 ^{Δ 8,11,14} und 20:4 ^{Δ 8,11,14,17}. Diese Analysen reflektieren die Ergebnisse aus drei unabhängigen Expressionsexperimenten.

B und D) Fettsäureprofile von Hefe, transformiert mit dem Leervektor pESC-TRP, in Gegenwart von jeweils 350 μ M 20:3 ^{Δ 8,11,14} und 20:4 ^{Δ 8,11,14,17}.

Figur 4: Umwandlungseffizienz von Ms Δ 6 und Ms Δ 5.

Desaturierungseffizienz von Ms Δ 6 (A) und Ms Δ 5 (B) ist als (Produkt x 100)/(Edukt + Produkt) angegeben. Jeder Wert ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Figur 5: Verteilung der Fettsäuren, produziert in Hefekulturen, welche Ms Δ 6 oder Ms Δ 5 exprimieren, auf Lipidklassen.

Hefekulturen, welche die *M. squamata*-Desaturasen exprimieren, wurden jeweils mit exogener 18:3 ^{Δ 9,12,15} oder 20:3 ^{Δ 8,11,14} versorgt und die Verteilung der Fettsäuren auf einzelne Lipidklassen wurde analysiert. A) und B) zeigen die Ergebnisse der Ms Δ 6-Expression in Hefe. C) und D) zeigen die Ergebnisse der Ms Δ 5-Expression in Hefe.

Die produzierte Fettsäure ist in Molprozent der Gesamt-Fettsäuren in der jeweiligen Lipidklasse (A und C) und in Molprozent des Gesamtgehalts an Lipid-assoziierten produzierten Fettsäuren (B und D) angegeben. Phosphatidylcholin (PC); Phosphatidylserin (PS); Phosphatidylinositol (PI); Phosphatidylethanolamin (PE); neutrale Lipide (NL).

Figur 6: Die Etablierung eines EPA-Biosynthesewegs in Hefe.

Der Hefestamm INVSc1 wurde entweder mit dem Leervektor transformiert (A) oder die verschiedenen Co-Expressionskonstrukte wurden mit der Fettsäure 18:3^{Δ9,12,15} supplementiert (B und C). FAMES von Zellpellets wurden mittels GC analysiert. Diese Analysen reflektieren die Ergebnisse aus drei unabhängigen Expressionsexperimenten.

Figur 7: Anreicherung von EPA in Hefe.

Der Hefestamm INVSc1, transformiert mit den *M. squamata*-Desaturasen zusammen mit der *P. patens*-Δ-6-Elongase oder mit den *P. tricornutum*-Desaturasen zusammen mit der *P. patens*-Δ-6-Elongase, wurde in Gegenwart von 18:3^{Δ9,12,15} wachsen gelassen. FAMES von Zellpellets wurden mittels GC analysiert. Diese Analysen reflektieren die Ergebnisse aus drei unabhängigen Expressionsexperimenten.

Figur 8: Verteilung der Stearidonsäure und Arachidonsäure in verschiedenen Lipidklassen.

Die Verteilung von Stearidonsäure, dem Produkt der Δ6-Desaturase, bzw. Arachidonsäure, dem Produkt der Δ5-Desaturase, in den verschiedenen Lipidklassen wurde in Hefekulturen, die MsΔ6 (Δ6-Desaturase aus *M. squamata*), OtΔ6 (Δ6-Desaturase aus *O. tauri*) oder PtΔ6 (Δ6-Desaturase aus *P. tricornutum*) exprimierten (A), bzw. in Hefekulturen, die MsΔ5 oder PtΔ5 exprimierten (B), analysiert.

NL: neutrale Lipide, PC: Phosphatidylcholin, PI/PS: Phosphatidylinositol mit Phosphatidylserin, CL: Diphosphatidylglycerin

Figur 9: Substratspezifität von Ms Δ 6 und Ot Δ 6

Hefekulturen wurden mit Ms Δ 6, Ot Δ 6 bzw. dem entsprechenden Leervektor pYES2 transformiert und die FAMEs aus den Kulturen mittels GC analysiert.

Figur 10: Acyl-CoA-Abhängigkeit von Ms Δ 6 und Ms Δ 5

Hefe-Expressionskulturen, die Ms Δ 6 exprimierten und Kontrollkulturen, die Pt Δ 6 bzw. Ot Δ 6 exprimierten, wurden nach 5 bzw. 60 Minuten nach Zugabe von exogenem 18:3 ^{Δ 9,12,15}-Substrat hinsichtlich der Gesamtfettsäuren (links) und der CoA-gebundenen Fettsäuren (rechts) durch GC analysiert (A).

Hefe-Expressionskulturen, die Ms Δ 5 (jeweils links) exprimierten und Kontrollkulturen, die Pt Δ 5 exprimierten (jeweils rechts), wurden nach 1, 4, 8 bzw. 24 Stunden nach Zugabe von exogenem 20:3 ^{Δ 8,11,14}-Substrat hinsichtlich der Gesamtfettsäuren (links) und der CoA-gebundenen Fettsäuren (rechts) durch GC analysiert (B).

Figur 11: Koexpression von Δ 6- und Δ 5- Desaturasen mit Acyl-CoA-Elongasen

Die Desaturasen Ms Δ 6, Ot Δ 6 und Pt Δ 6 wurden jeweils mit der Δ 6-Elongase PSE1 aus dem Moos *P. patens* in Hefe koexprimiert, die Fettsäure 18:3 ^{Δ 9,12,15} zugefüttert und die Fettsäurezusammensetzung durch GC analysiert (A). Als Kontrolle diente eine Kultur, die mit dem Leervektor pESC-LEU transformiert worden war.

Die Desaturasen Ms Δ 5 und Pt Δ 5 wurden jeweils mit der Δ 5-Elongase OtELO5 aus *O. tauri* in Hefe koexprimiert, die Fettsäure 20:4 ^{Δ 8,11,14,17} zugefüttert und die Fettsäurezusammensetzung durch GC analysiert (B). Als Kontrolle diente eine

Kultur, die mit den Leervektoren pESC-TRP und pESC-URA transformiert worden war.

Figur 12: Binäre pCAMBIA-Vektoren für die Transformation von Pflanzen

A) Binärer Vektor mit Expressionskassetten für Ms Δ 6, PSE1 und Ms Δ 5 unter der Kontrolle des USP-Promotors, dessen Transformation zu Triple-Ms-Pflanzen führte.

B) Binärer Vektor mit Expressionskassetten für Pt Δ 6, PSE1 und Pt Δ 5 unter der Kontrolle des USP-Promotors, dessen Transformation zu Triple-Pt-Pflanzen führte.

LB und RB: linke und rechte T-DNA-Grenzen; USP: USP-Promotor aus *Vicia faba*; Ms Δ 6 und Pt Δ 6: Δ 6-Desaturasen aus *M. squamata* bzw. *P. tricornutum*; Ms Δ 5 und Pt Δ 5: Δ 5-Desaturasen aus *M. squamata* bzw. *P. tricornutum*; PSE1: Δ 6-Elongase aus *P. patens*; OCS: Terminatorregion des Octopinsynthasegens von *A. tumefaciens*; 35S-Prom: 35S-Promotor von CaMV; 35S-Term.: CaMV-35S-Terminator; bar: Glufosinatresistenzgen; Kan: Kanamycinresistenzgen

Figur 13: Fettsäureanalyse von Arabidopsis-Samen

Die Menge der Fettsäuren 18:2 ^{Δ 9,12}, 18:3 ^{Δ 9,12,15}, 20:3 ^{Δ 11, 14,17} (A), 18:4 ^{Δ 6,9,12,15}, 20:4 ^{Δ 8,11,14,17}, 20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17} (B) sowie 18:3 ^{Δ 6,9,12}, 20:3 ^{Δ 8,11, 14} und 20:4 ^{Δ 5,8,11,14} (C) wurde in Samen von einzelnen Arabidopsis-Pflanzen, die Ms Δ 6, PSE1 und Ms Δ 5 (Ms3er-29, Ms3er-2, Ms3er-22) bzw. Pt Δ 6, PSE1 und Pt Δ 5 (Pt3er-16, Ot3er-7, Pt3er-24) exprimierten, durch GC bestimmt. Zusätzlich wurde der Mittelwert für die jeweilige Fettsäure aus den Werten der einzelnen Samen berechnet (jeweils ganz rechte Grafik).

Figur 14: Fettsäureanalyse von Triple-Ms-, Triple-Ot- und Triple-Pt-Arabidopsis-Samen

Fettsäureprofile von Einzelsamenanalysen der Triple-Ms-, Triple-Ot- und Triple-Pt-Pflanzen. Dargestellt sind repräsentative GC-Fettsäureprofile von Einzelsamen der transgenen Triple-Ms- (A), Triple-Ot- (B) und Triple-Pt- (C) *Arabidopsis*-Pflanzen aus drei bis acht unabhängigen Messungen. Die Fettsäuren wurden durch Vergleich mit einem authentischen Standardgemisch verglichen und darüber identifiziert (D).

Figur 15: ω 3-Fettsäuregehalt transgener *Arabidopsis* Pflanzen

Einzelsamenanalyse von jeweils zwei bzw. drei unabhängigen Triple-Ms (Triple-Ms-29, Triple-Ms-2, Triple-Ms-22), Triple-Ot (Triple-Ot-2, Triple-Ot-4) und Triple-Pt (Triple-Pt-16, Triple-Pt-7, Triple-Pt-24) *Arabidopsis* Linien wurde durchgeführt. (A) Mittelwerte und Einzelwerte der Samenanalysen von ω 3-18:3 ^{Δ 9,12,15}, (B) dem Δ 6-Desaturierungsprodukt ω 3-18:4 ^{Δ 6,9,12,15}, (C) dem Elongationsprodukt der Δ 6-Elongase, ω 3-20:4 ^{Δ 8,11,14,17} und (D) dem Endprodukt des ω 3-VLCPUFA-Biosynthesewegs EPA, ω 3-20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17}.

Figur 16: ω 6-Fettsäuregehalt transgener *Arabidopsis* Pflanzen

Einzelsamenanalyse von zwei oder drei unabhängigen Triple-Ot und Triple-Pt *Arabidopsis* Linien wurde durchgeführt. (A) Mittelwerte und Einzelwerte der Samenanalysen von ω 6-18:2 ^{Δ 9,12}, (B) dem Δ 6-Desaturierungsprodukt ω 6-18:3 ^{Δ 6,9,12}, (C) dem Elongationsprodukt der Δ 6-Elongase, ω 6-20:3 ^{Δ 8,11,14} und (D) dem Endprodukt des ω 6-VLCPUFA-Biosynthesewegs AA, ω 6-20:4 ^{Δ 5,8,11,14}.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Verfahren zur Herstellung von ω 3-Fettsäuren in transgenen Organismen, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende/n Verfahrensschritt/e umfasst:

a) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer Δ -6-Desaturase kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, und Derivaten der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide kodieren, die auf Aminosäureebene mindestens 40% Identität mit SEQ ID NO:2 aufweisen und eine Δ -6-Desaturaseaktivität haben,
und/oder

b) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer Δ -5-Desaturase kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Sequenz, Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, und Derivaten der in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide kodieren, die auf Aminosäureebene mindestens 40% Identität mit SEQ ID NO:4 aufweisen und eine Δ -5-Desaturaseaktivität haben.

2. Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere von Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Stearidonsäure, gamma-Linolensäure, Docosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure in transgenen Organismen mit einem Gehalt von mindestens 1 Gew.% dieser Verbindungen

bezogen auf den Gesamtlipidgehalt des transgenen Organismus, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende/n Verfahrensschritt/e umfasst:

a) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer Δ -6-Desaturase kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, und Derivaten der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide kodieren, die auf Aminosäureebene mindestens 40% Identität mit SEQ ID NO:2 aufweisen und eine Δ -6-Desaturaseaktivität haben,

und/oder

b) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer Δ -5-Desaturase kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Sequenz, Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, und Derivaten der in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide kodieren, die auf Aminosäureebene mindestens 40% Identität mit SEQ ID NO:4 aufweisen und eine Δ -5-Desaturaseaktivität haben.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, weiter umfassend das Einbringen einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer Δ -6-Elongase kodiert.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Polypeptid mit der Aktivität einer Δ -6-Elongase aus *P. patens* stammt.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, weiter umfassend das Einbringen einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer ω -3-Desaturase kodiert.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, weiter umfassend das Einbringen einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer Δ -5-Elongase, einer Δ -4-Desaturase, einer Δ -12-Desaturase, einer Δ -15-Desaturase, einer bifunktionalen Δ -12- und Δ -15-Desaturase, einer Lysophospholipid-Acyltransferase, einer Diacylglycerol-Acyltransferase und/oder einer Phospholipid-Diacylglycerol-Acyltransferase kodiert.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich bei dem Organismus um einen Mikroorganismus, einen Pilz, eine Hefe oder eine Pflanze handelt.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich bei dem Organismus um eine Öl-produzierende Pflanze, Gemüse-, Salat- oder Zierpflanze handelt.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich bei dem Organismus um eine Nutzpflanze handelt, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzenfamilien bestehend aus den Familien der Aceraceae, Actinidiaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Arecaceae, Asteraceae, Arecaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Cannabaceae, Cannaceae, Caprifoliaceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Dioscoreaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Fagaceae, Grossulariaceae, Juglandaceae, Lauraceae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Moraceae, Musaceae, Oleaceae, Oxalidaceae, Papaveraceae, Poaceae, Polygonaceae, Punicaceae,

Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Sterculiaceae und Valerianaceae.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Gehalt an Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Stearidonsäure, gamma-Linolensäure, Docosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure in dem transgenen Organismen mindestens 4 Gew.% dieser Verbindungen bezogen auf den Gesamtlipidgehalt des Organismus beträgt.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Stearidonsäure, gamma-Linolensäure, Docosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure in dem Organismus vorwiegend als Ester in Phospholipiden oder Triacylglyceriden gebunden vorliegt.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Stearidonsäure, gamma-Linolensäure, Docosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure aus dem Organismus in Form ihrer Öle, Lipide oder freien Fettsäuren isoliert wird.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzliche weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels eingebracht werden, ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), FettsäureAcyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen,

AllenoxidSynthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n).

14. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, hergestellt durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13.

15. Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung, die langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren hergestellt nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13 umfasst und von transgenen Pflanzen stammt.

16. Verfahren zur Herstellung von Ölen, Lipiden oder Fettsäurezusammensetzungen durch Mischen von Öl, Lipiden oder Fettsäuren gemäß Anspruch 14 oder Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung nach Anspruch 15 mit tierischen Ölen, Lipiden oder Fettsäuren.

17. Verwendung von Öl, Lipiden oder Fettsäuren gemäß Anspruch 14 oder Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzungen gemäß Anspruch 15 oder Ölen, Lipiden oder Fettsäurezusammensetzungen hergestellt gemäß Anspruch 16 in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

18. Isoliertes Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer Δ -6-Desaturase kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, und Derivaten der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide kodieren, die auf Aminosäureebene mindestens 68 % Identität mit SEQ ID NO:2 aufweisen und eine Δ -6-Desaturaseaktivität haben.

19. Isoliertes Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer Δ -5-Desaturase kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO:3 dargestellten Sequenz, Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO:4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, und Derivaten der in SEQ ID NO:3 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide kodieren, die auf Aminosäureebene mindestens 67 % Identität mit SEQ ID NO:4 aufweisen und eine Δ -5-Desaturaseaktivität haben.

20. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 18 oder 19, wobei die Sequenz von einer Alge, einem Pilz, einem Mikroorganismus, einer Pflanze oder einem nicht-humanen Tier stammt.

21. Aminosäuresequenz, die von einer Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 18 bis 20 kodiert wird.

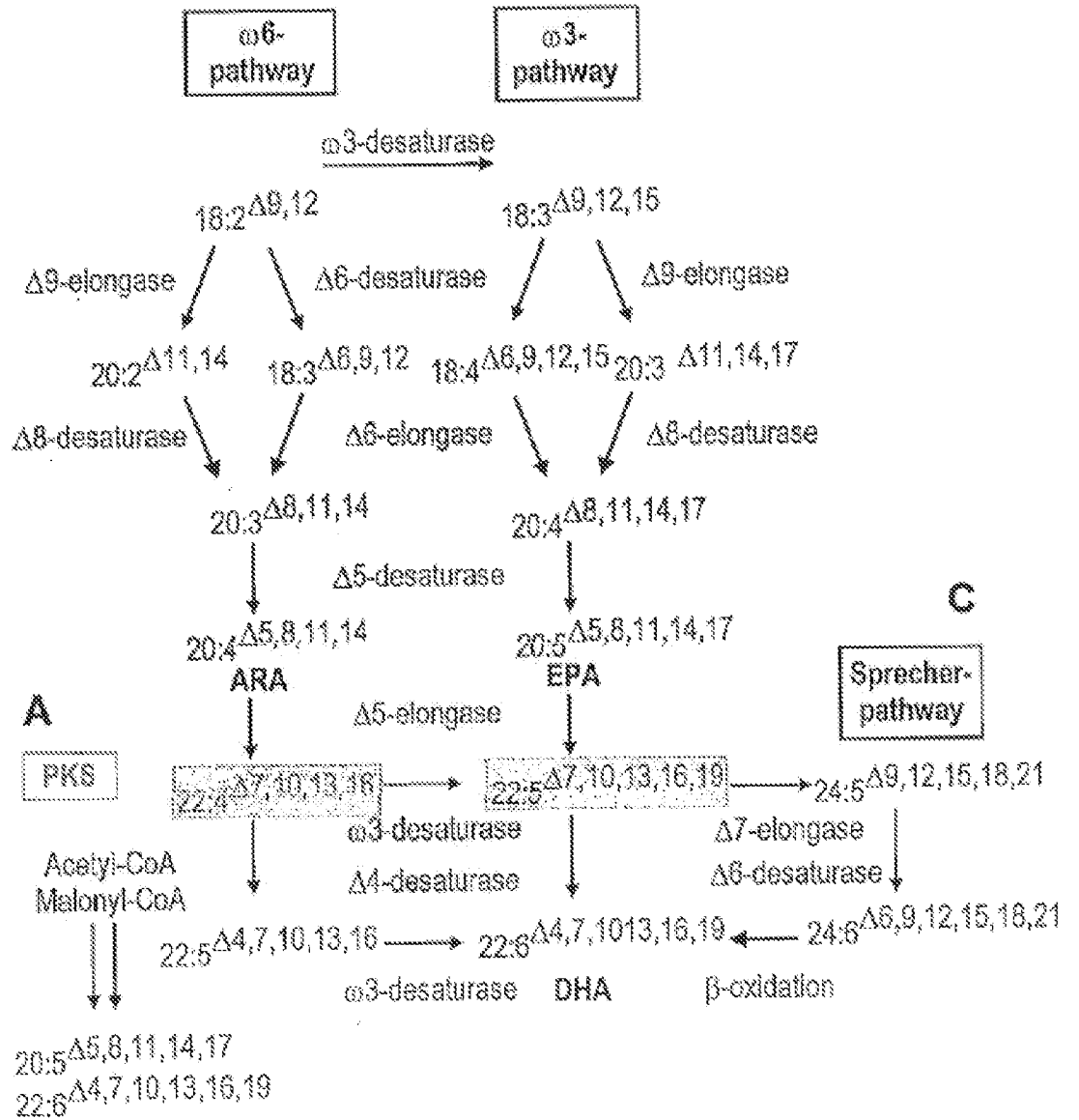
22. Genkonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei die Nukleinsäuresequenz funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist.

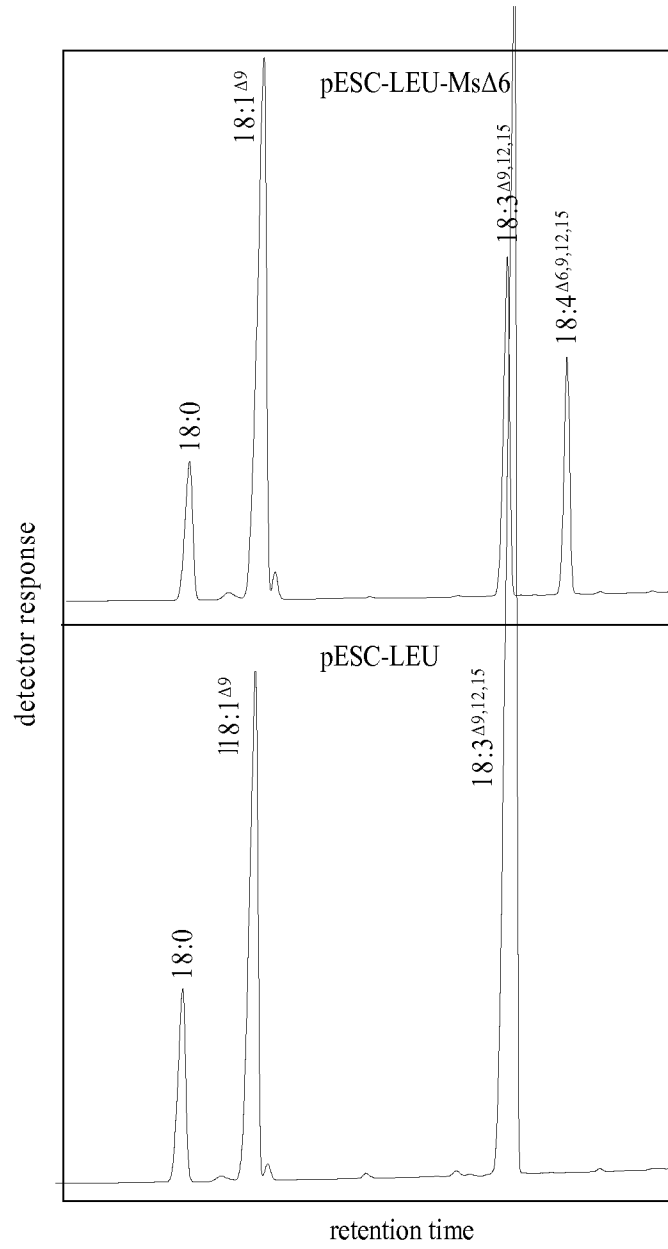
23. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 18 bis 20 oder ein Genkonstrukt nach Anspruch 22.

24. Transgener nicht-humaner Organismus, enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 18 bis 20, ein Genkonstrukt nach Anspruch 22 oder einen Vektor nach Anspruch 23.

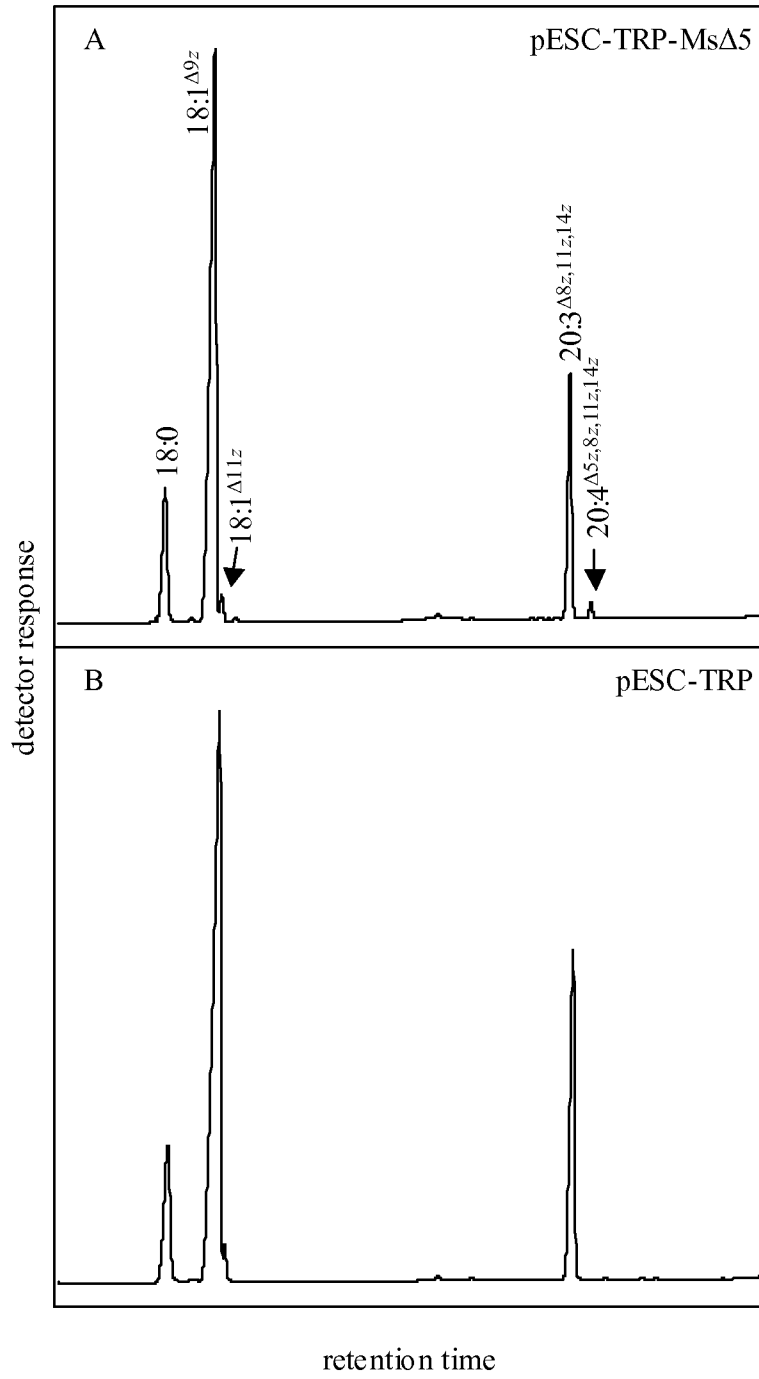
25. Transgener nicht-humaner Organismus nach Anspruch 24, wobei der Organismus eine Pflanze ist.

Figur 1

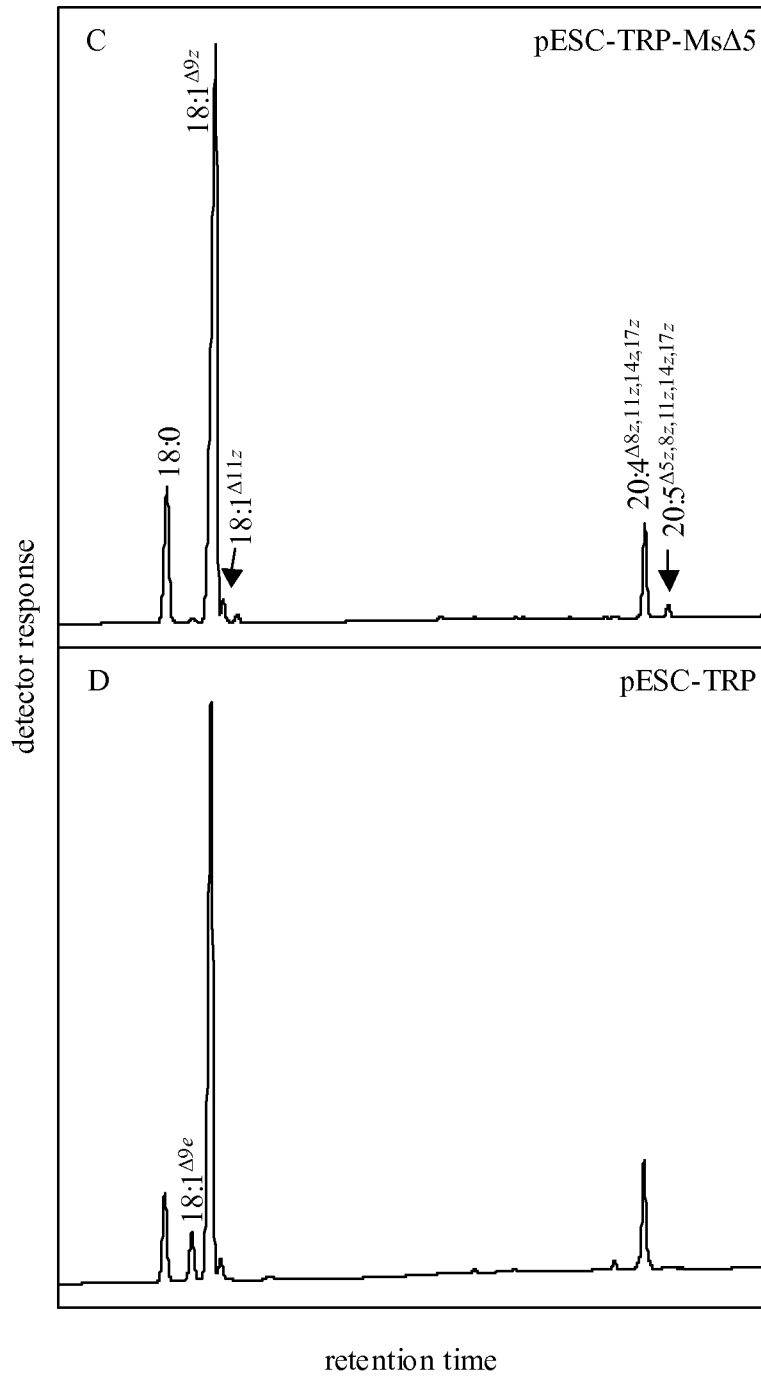




Figur 2

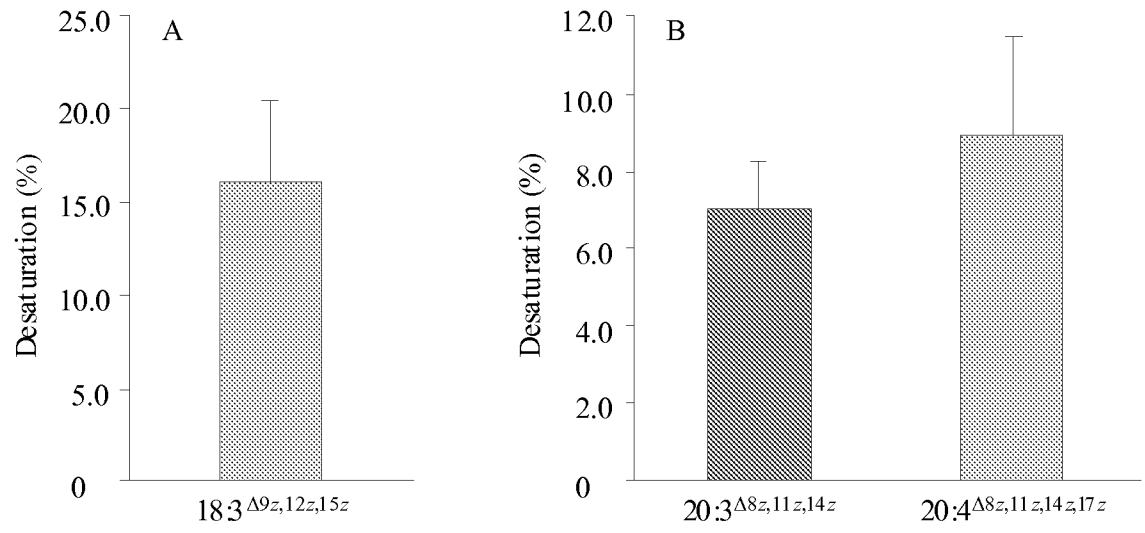


Figur 3

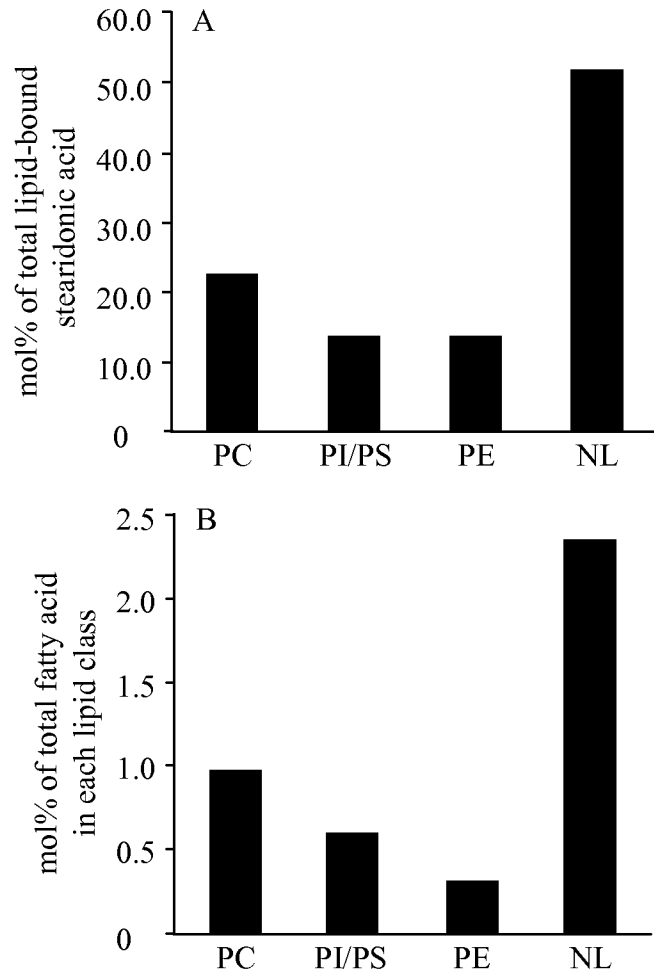


Figur 3

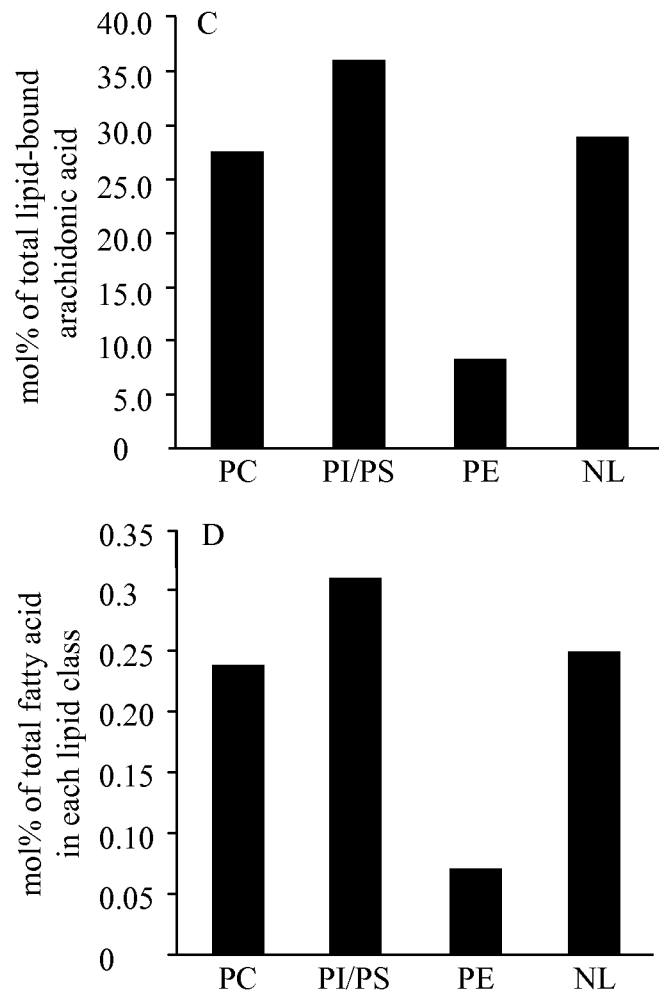
Figur 4



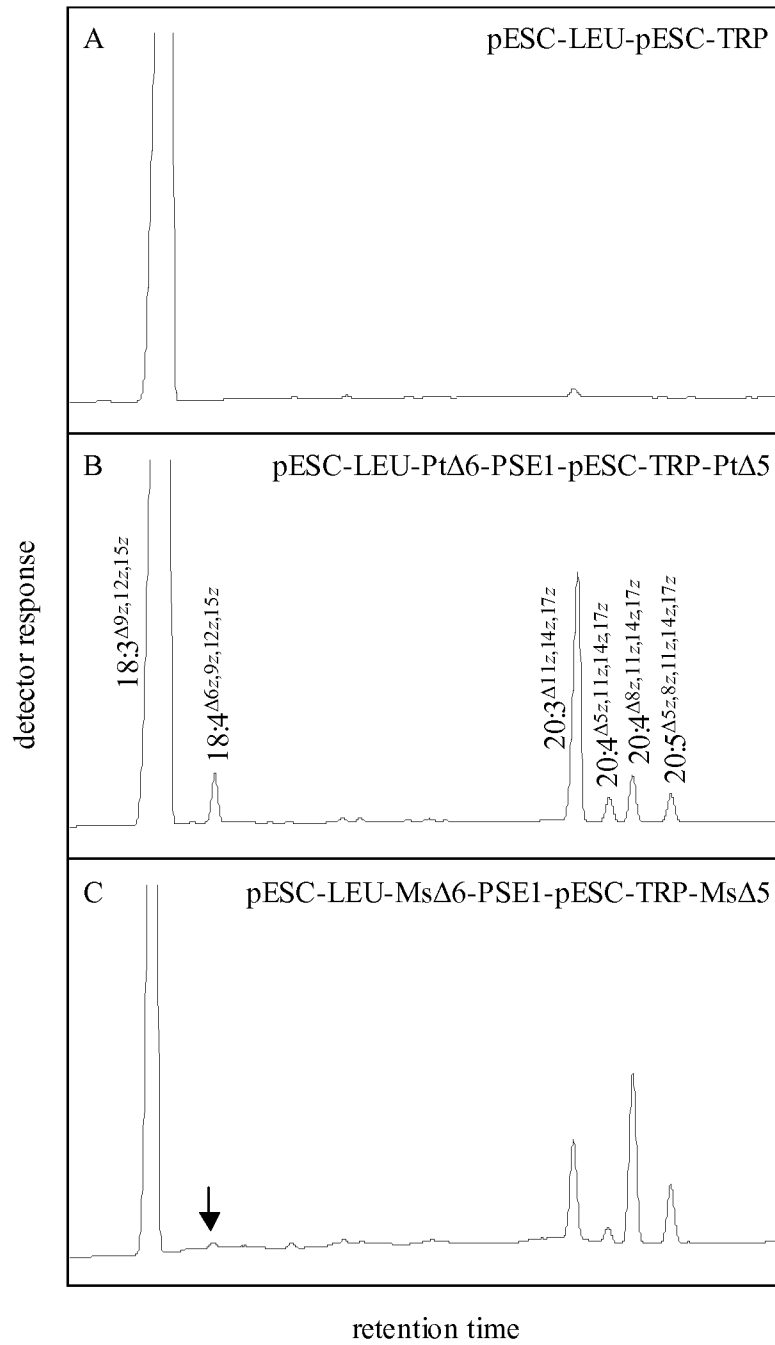
Figur 5



Figur 5

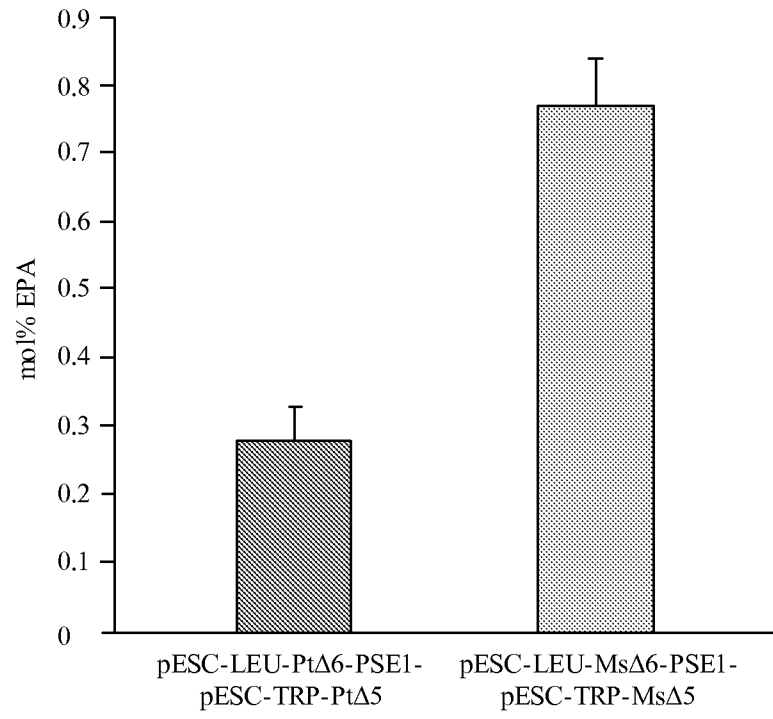


Figur 6



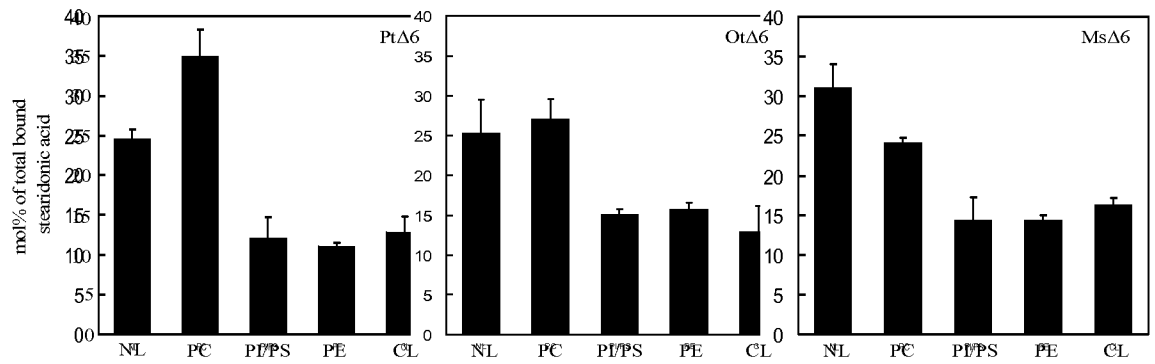
- 9 / 23 -

Figur 7

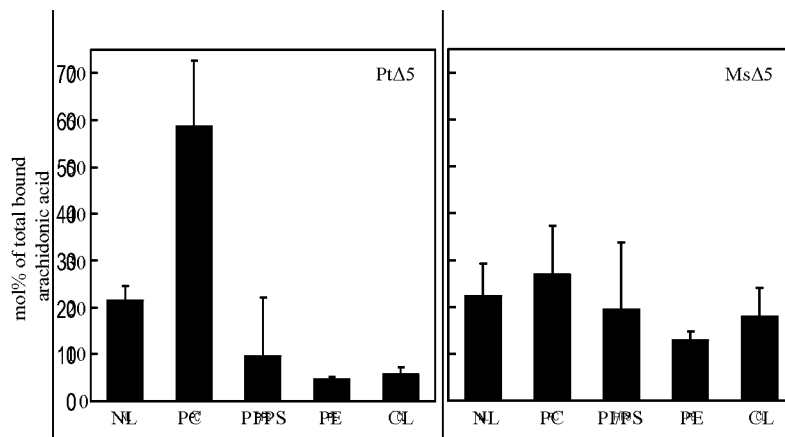


Figur 8

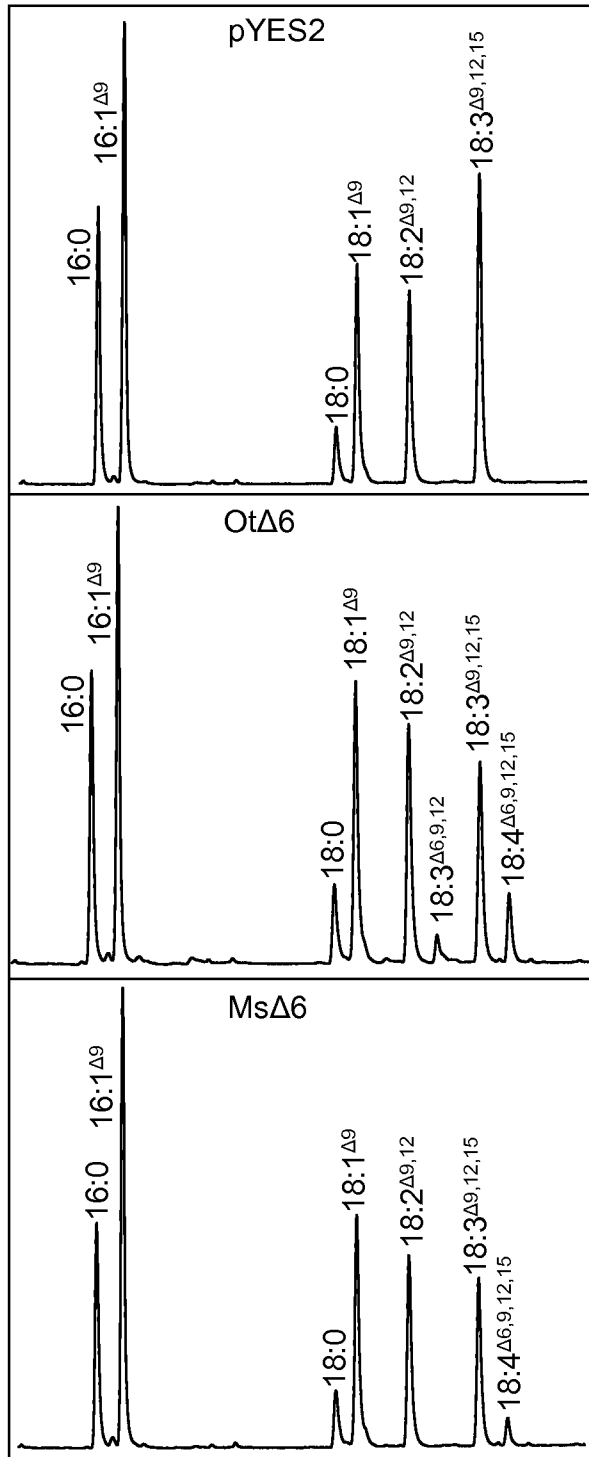
A



B

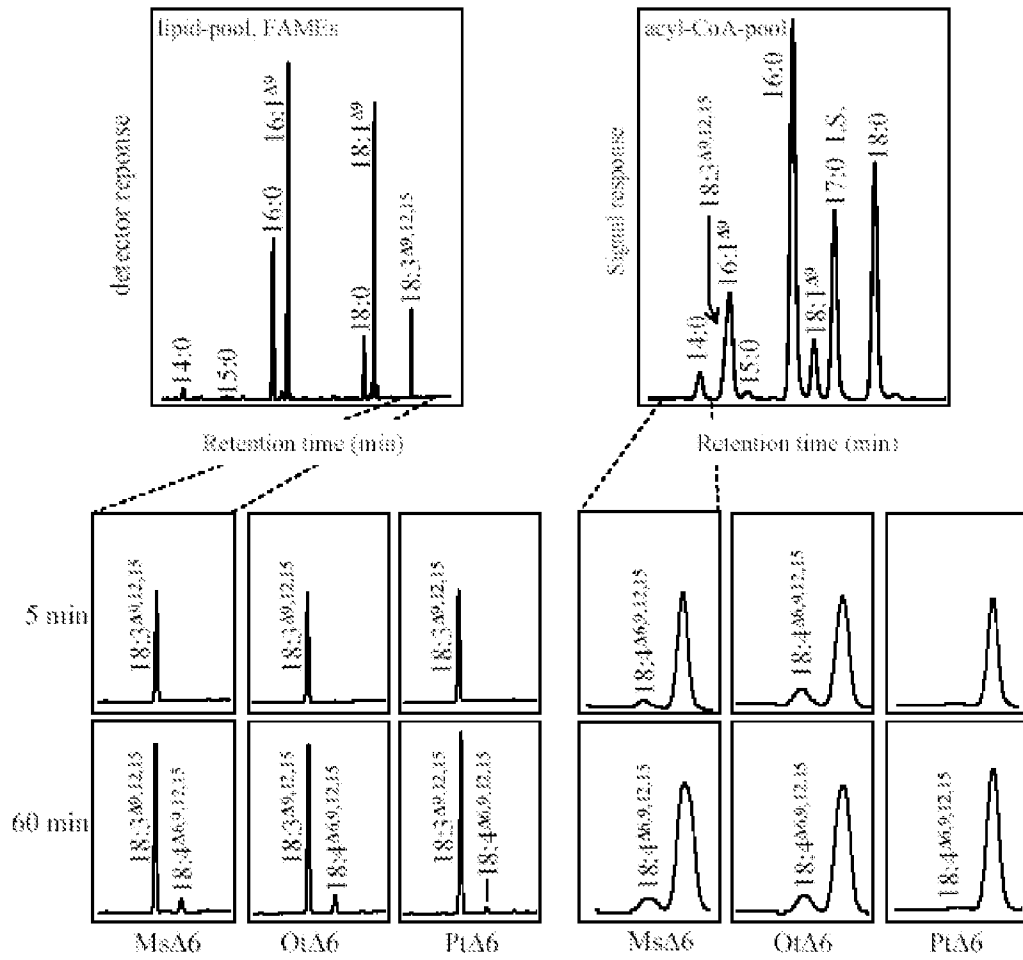


Figur 9



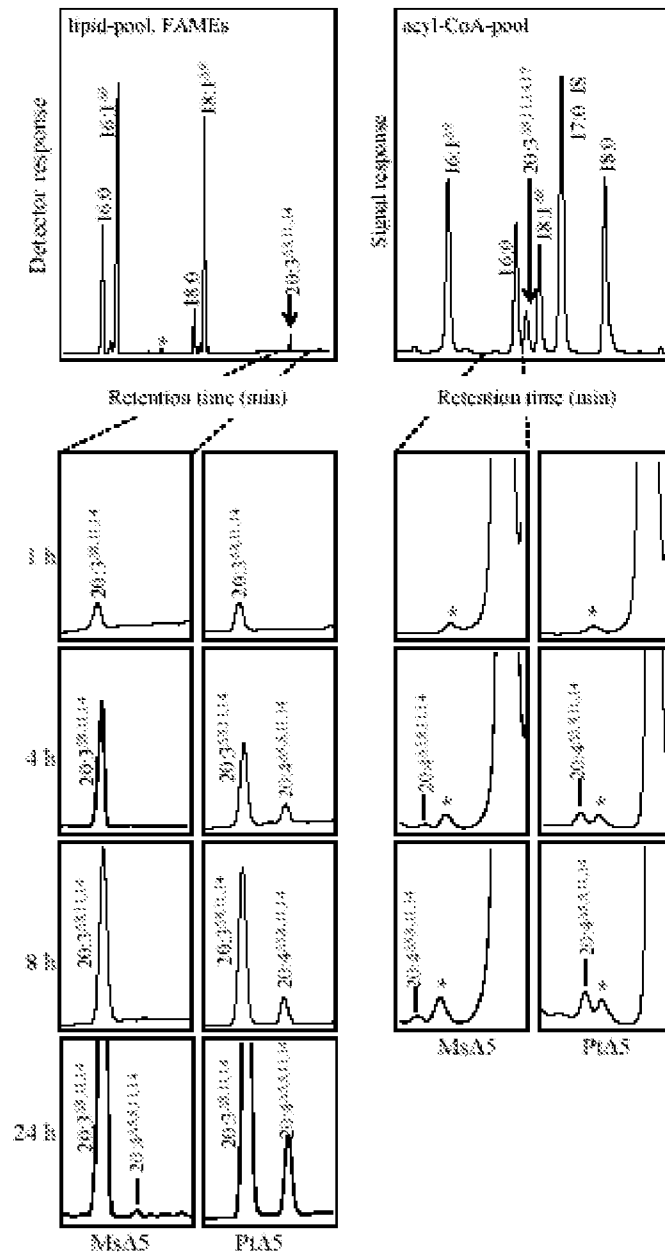
Figur 10

A



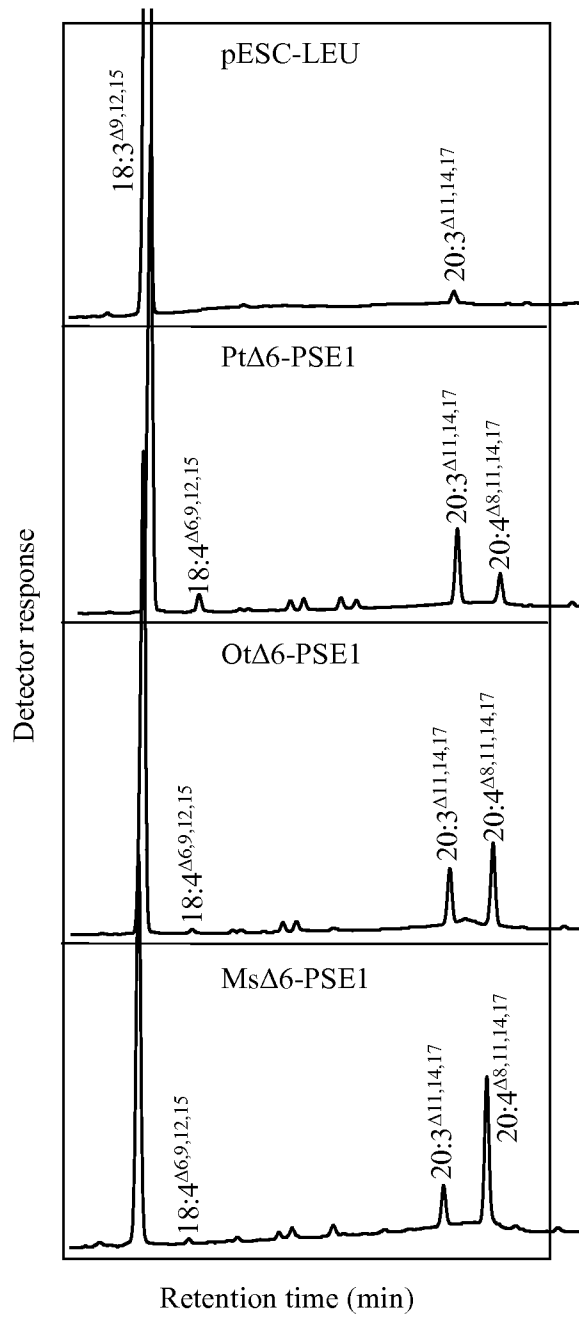
Figur 10

B



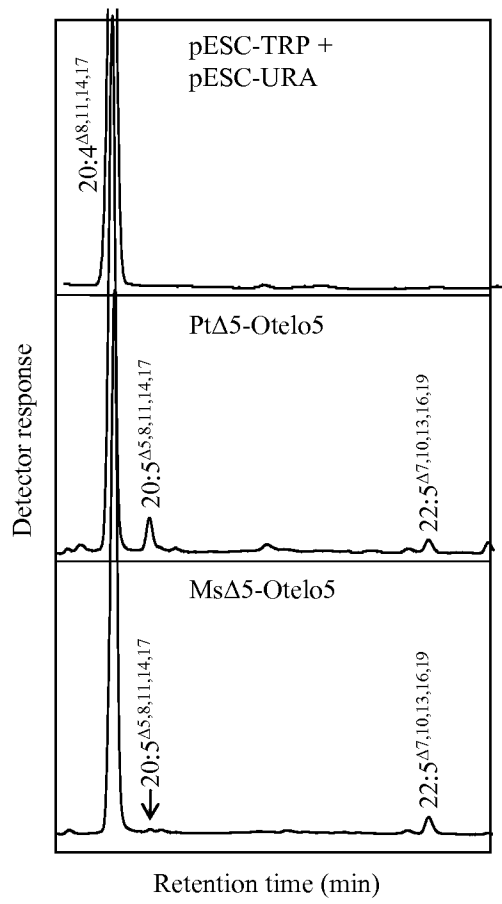
Figur 11

A



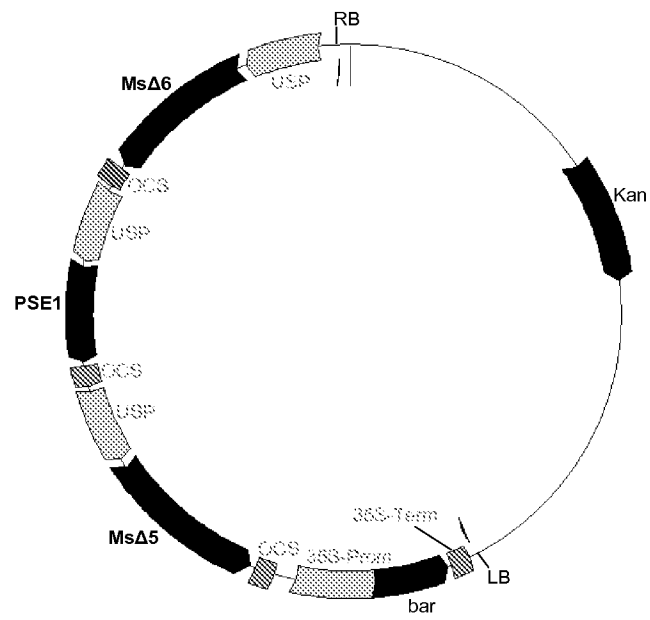
Figur 11

B



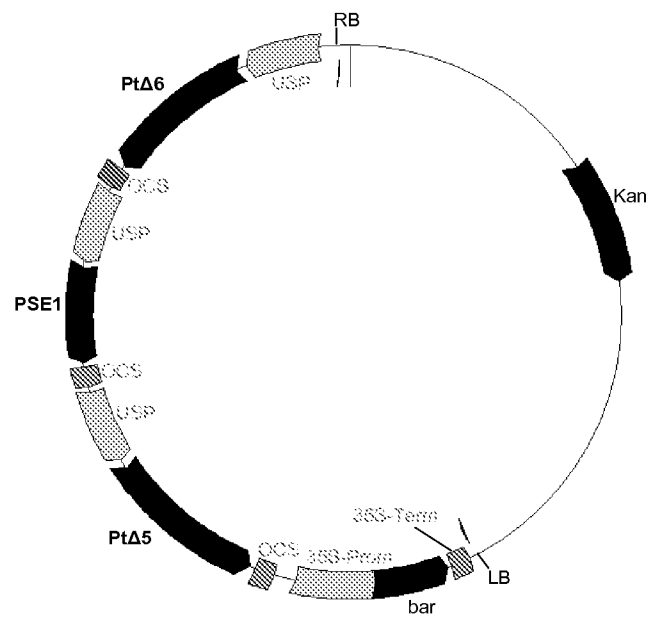
Figur 12

A



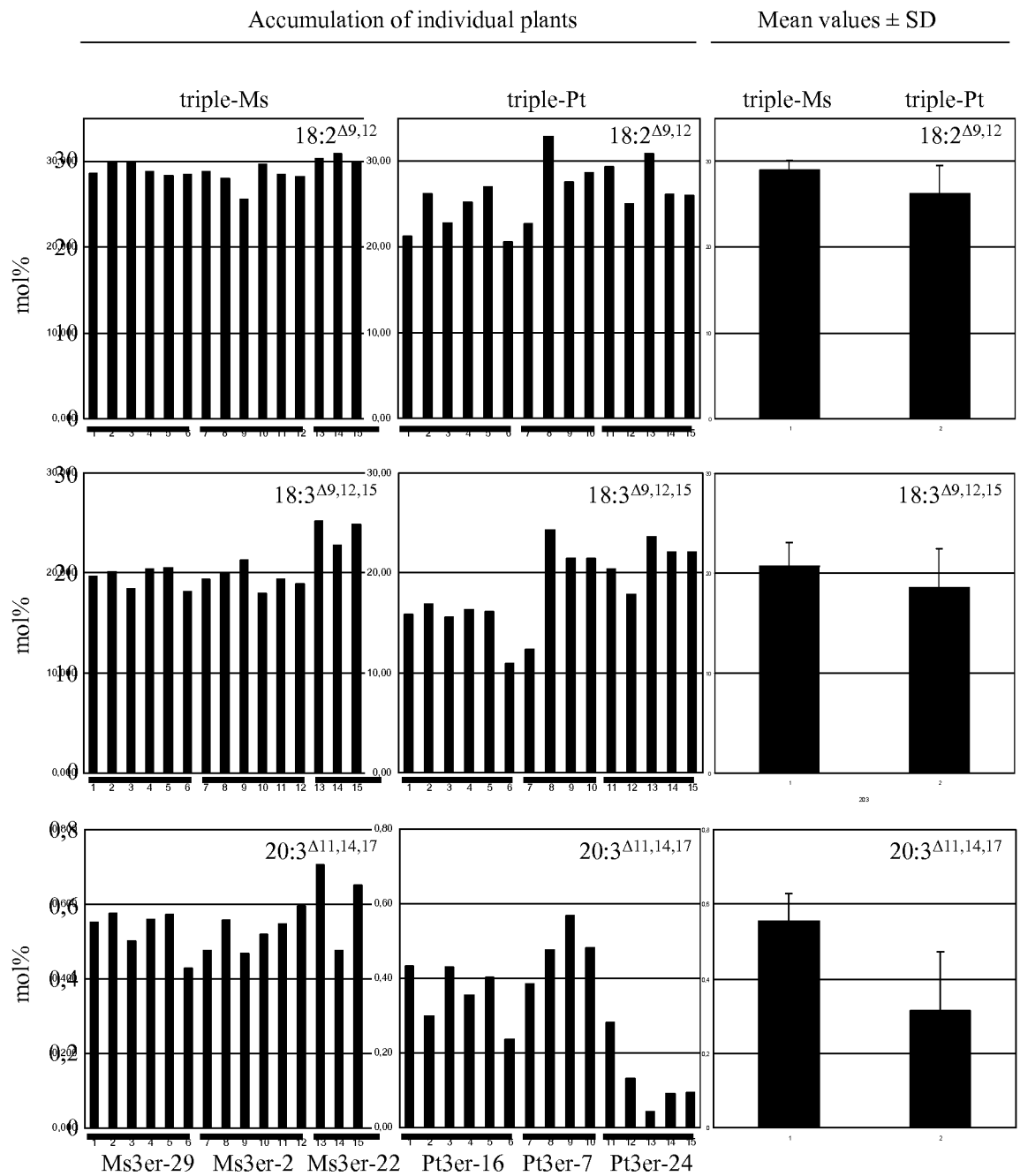
Figur 12

B



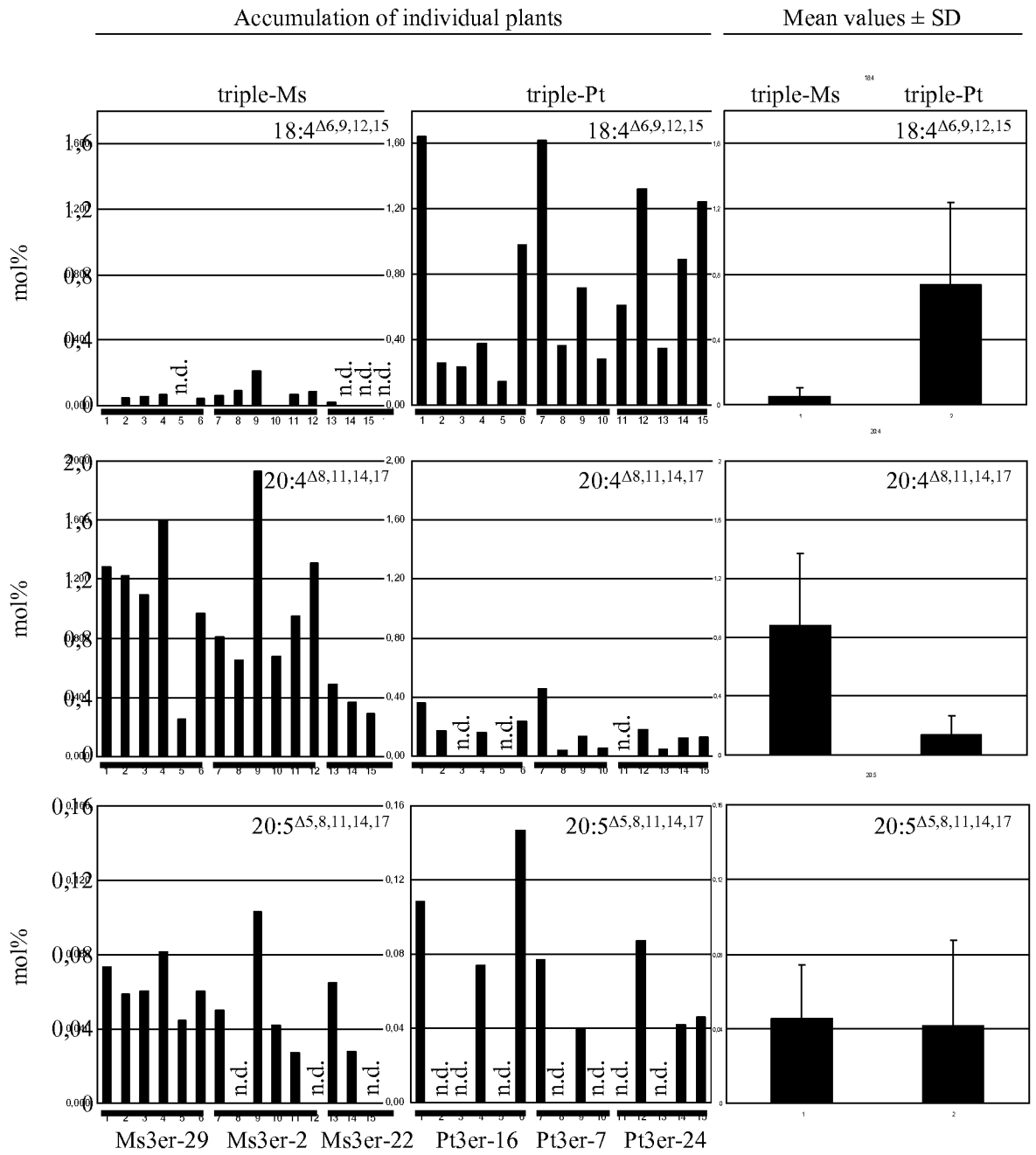
Figur 13

A



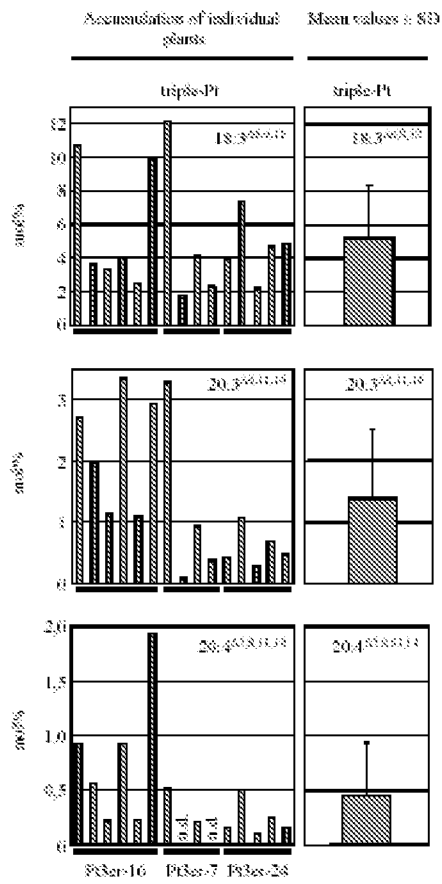
Figur 13

B

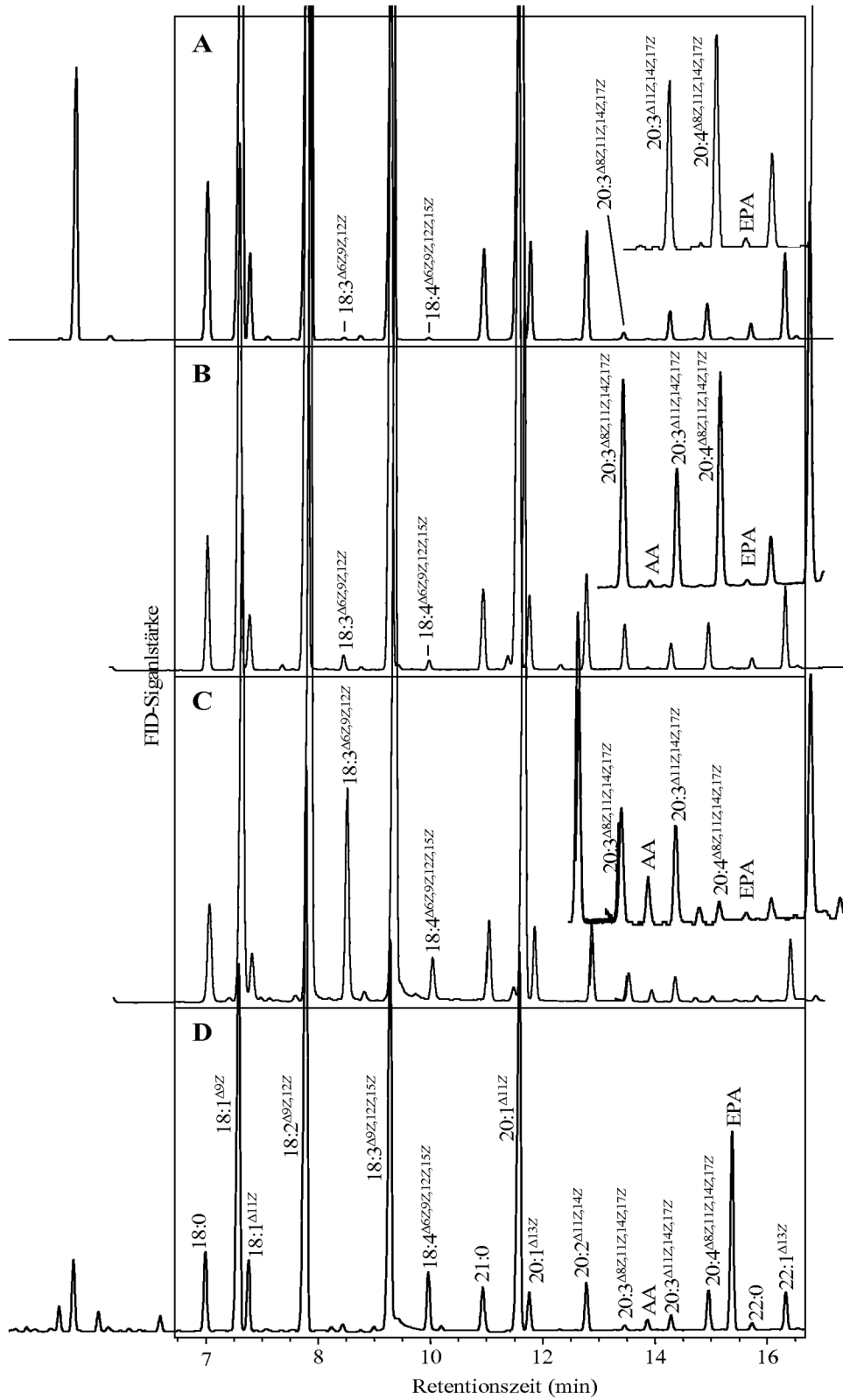


Figur 13

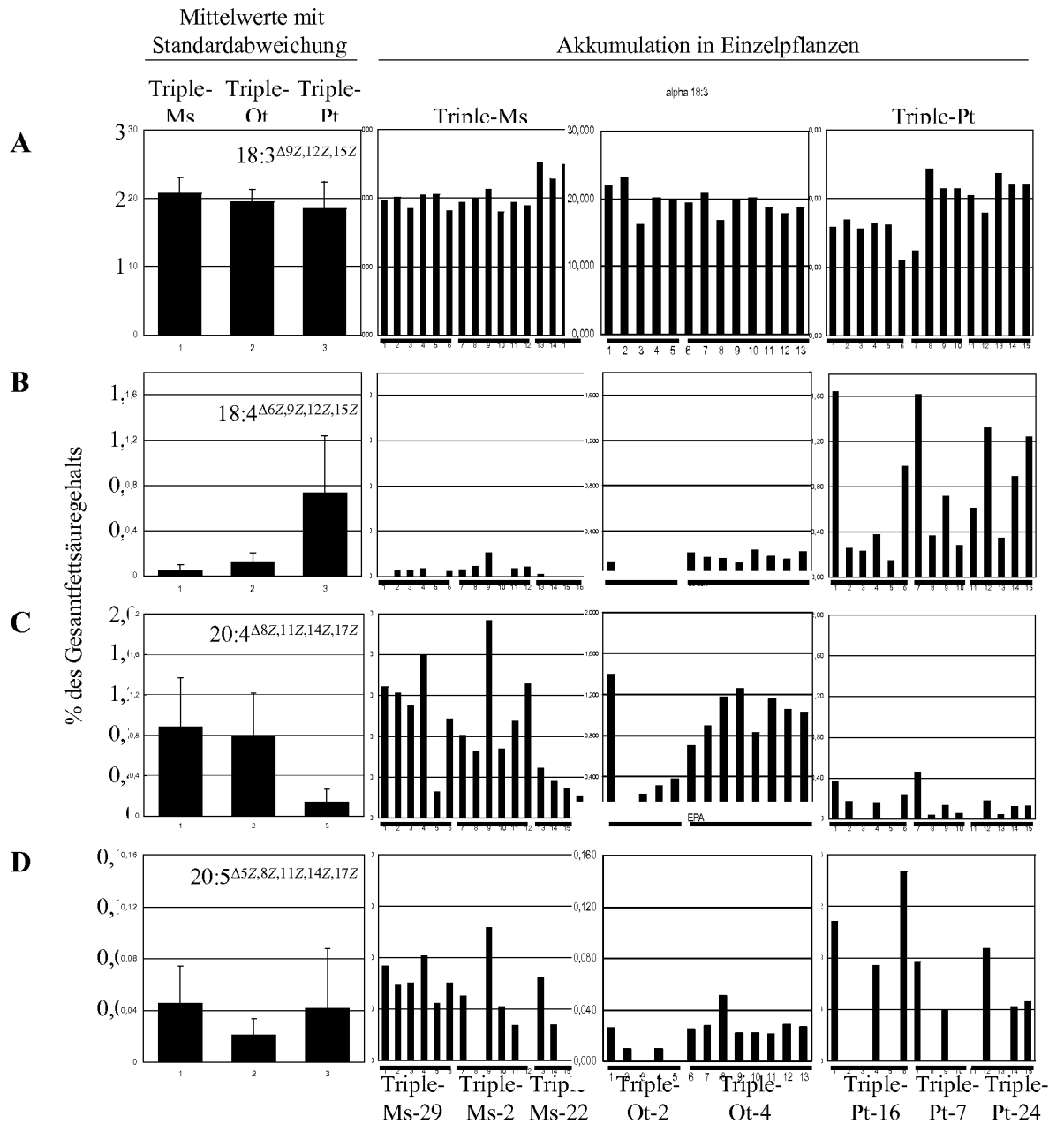
C



Figur 14



Figur 15



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/052358

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/82 C12N15/53 C12N9/02 C12P7/64 A23D9/00
A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C12P A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | WO 2005/083093 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE]; CIRPUS PETRA [DE]; BAUER JOERG [DE]; QIU) 9 September 2005 (2005-09-09) see SEQ ID NO: 10 and 90 page 1 - page 8; examples 4, 10-16, 31-37, 57-61 page 66 - page 69 <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">----- -/--</div> | 1-25 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 Juli 2008

Date of mailing of the international search report

01/08/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Oderwald, Harald

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/052358

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>ABBADI A ET AL: "Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: Constraints on their accumulation" PLANT CELL, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, vol. 16, no. 10, 1 October 2004 (2004-10-01), pages 2734-2748, XP002334261 ISSN: 1040-4651 cited in the application the whole document</p> | 1-25 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/052358

| Patent document cited in search report | | Publication date | | Patent family member(s) | Publication date |
|--|---|------------------|----|-------------------------|------------------|
| WO 2005083093 | A | 09-09-2005 | AU | 2005217079 A1 | 09-09-2005 |
| | | | CA | 2559360 A1 | 09-09-2005 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/052358

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C12N15/82 C12N15/53 C12N9/02 C12P7/64 A23D9/00
A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12N C12P A01H

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | WO 2005/083093 A (BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE]; CIRPUS PETRA [DE]; BAUER JOERG [DE]; QIU) 9. September 2005 (2005-09-09) see SEQ ID NO: 10 and 90 Seite 1 - Seite 8; Beispiele 4,10-16,31-37,57-61 Seite 66 - Seite 69 ----- -/-- | 1-25 |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

| | |
|---|--|
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absenddatum des internationalen Recherchenberichts |
| 22. Juli 2008 | 01/08/2008 |

| | |
|---|---|
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Oderwald, Harald |
|---|---|

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2008/052358

| C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|---|--|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | <p>ABBADI A ET AL: "Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: Constraints on their accumulation" PLANT CELL, AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD, US, Bd. 16, Nr. 10, 1. Oktober 2004 (2004-10-01), Seiten 2734-2748, XP002334261 ISSN: 1040-4651 in der Anmeldung erwähnt, das ganze Dokument</p> | 1-25 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/052358

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

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

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2008/052358

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

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

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

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

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

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

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

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

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.

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

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

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- Die Zahlung der zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

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

1. Ansprüche: 1-17, 20-25 teilweise, 18 komplett

Verfahren zur Herstellung von omega3-Fettsäuren unter Verwendung einer delta-6-Desaturase. Öle, Lipide und Fettsäuren und Zusammensetzungen, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendungen. Nukleinsäuremolekül (SEQ ID NO: 1) und Polypeptid (SEQ ID NO: 2), Genkonstrukt, Vektor, transgener Organismus, welcher delta-6-Desaturase enthält.

2. Ansprüche: 1-17, 20-25 teilweise, 19 vollständig

Entsprechend Erfindung, umfassend eine Delta-5-Desaturase (SEQ ID NO: 3 and 4).

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/052358

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 2005083093 A | 09-09-2005 | AU 2005217079 A1 CA 2559360 A1 | 09-09-2005 09-09-2005 |
| ----- | | | |