

(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
10. Mai 2007 (10.05.2007)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/051577 A2

(51) **Internationale Patentklassifikation:**
C12N 15/82 (2006 01) C07K 14/415 (2006 01)

(21) **Internationales Aktenzeichen:** PCT/EP2006/0 10408

(22) **Internationales Anmeldedatum:**
30 Oktober 2006 (30 10 2006)

(25) **Einreichungssprache:** Deutsch

(26) **Veröffentlichungssprache:** Deutsch

(30) **Angaben zur Priorität:**
10 2005 052 551 2
2 November 2005 (02 11 2005) DE

(71) **Anmelder** (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **RÖTHAMSTED RESEARCH** [—/GB], AL5 2JQ, Harpenden (GB)

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder** (nur für US): **NAPIER, Johnathan**, A. [GB/GB], The Wilderness, Butchers Lane, Preston, Hertfordshire SG4 7TR (GB) **SAYANOVA, Olga** [GB/GB], Rothamsted Research, Harpenden, Herts AL5 2JQ (GB) **VENEGAS CALERON, Monica** [ES/GB], 3B Lawes Court, 55 Milton Road, Harpenden AL5 5pNX Herts (GB)

(74) **Anwalt:** **POPP, Andreas**, BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE)

(81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, 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

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): **ARIPO** (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

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

(54) **Title:** METHOD FOR THE PRODUCTION OF γ -LINOLENIC ACID AND/OR STEARIDONIC ACID IN TRANSGENIC BRASSICACEAE AND LINACEAE

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON γ -LINOLENSAURE UND/ ODER STEARIDONSAURE IN TRANSGENEN BRASSICACEAE UND LINACEAE

(57) **Abstract:** The invention relates to the production of γ -hnolemc acid (18 3 $\Delta^{6,9,12}$) or stearidomc acid (18 4 $\Delta^{6,9,12,15}$) or γ -hnolemc acid (18 3 $\Delta^{6,9,12}$) and steardonic acid (18 4 $\Delta^{6,9,12,15}$) in transgenic plants of the *brassicaceae* family, said transgenic plants containing at least 10 percent by weight of oleic acid relative to the total fatty acid concentration and being provided with an increased Δ -6-C₁₈ fatty acid concentration as a result of the activity of the Δ -6 desaturases used in the method. The invention also relates to novel nucleic acid sequences coding for the Δ -6 desaturases used in the method, gene constructs containing said nucleic acid sequences, a vector and transgenic plants containing at least one nucleic acid sequence or a gene construct.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von γ -Linolensäure (18 3 $\Delta^{6,9,12}$) oder Stearidonsäure (18 4 $\Delta^{6,9,12,15}$) oder γ -Linolensäure (18 3 $\Delta^{6,9,12}$) und Stearidonsäure (18 4 $\Delta^{6,9,12,15}$) in transgenen Pflanzen der Familie Brassicaceae, wobei die transgenen Pflanzen mindestens 10 Gew-% Ölsäure bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt enthalten und durch die Aktivität der im Verfahren verwendeten Δ -6-Desaturasen einen erhöhten Gehalt an Δ -6-C₁₈-Fettsäuren aufweisen. Außerdem betrifft die Erfindung neue Nukleinsäuresequenzen, die für die im Verfahren verwendeten Δ -6-Desaturasen codieren, Genkonstrukte enthaltend diese Nukleinsäuresequenzen, einen Vektor und transgene Pflanzen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. ein Genkonstrukt.

WO 2007/051577 A2

Verfahren zur Herstellung von γ -Linolensäure und/ oder Stearidonsäure in transgenen Brassicaceae und Linaceae

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von γ -Linolensäure (18:3 $\Delta^{6,9,12}$) oder Stearidonsäure (18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$) oder γ -Linolensäure (18:3 $\Delta^{6,9,12}$) und Stearidonsäure (18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$) in transgenen Pflanzen der Familie Brassicaceae, wobei die transgenen Pflanzen mindestens 10 Gew-% Ölsäure bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt enthalten und durch die Aktivität der im Verfahren verwendeten Δ -6-Desaturasen einen erhöhten Gehalt an Δ -6-C₁₈-Fettsäuren aufweisen.

10 Außerdem betrifft die Erfindung neue Nukleinsäuresequenzen, die für die im Verfahren verwendeten Δ -6-Desaturasen codieren, Genkonstrukte enthaltend diese Nukleinsäuresequenzen, einen Vektor und transgene Pflanzen enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz bzw. ein Genkonstrukt.

15 Fettsäuren und Triglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem ob es sich um freie gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren oder um Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet.

20 Mehrfach ungesättigte langkettige ω -3-Fettsäuren wie Eicosapentaensäure (EPA) oder Docosahexaensäure (DPA) sind wichtige Komponenten der menschlichen Ernährung aufgrund ihrer verschiedenen Rollen in der Gesundheit, die Aspekte wie die Entwicklung des kindlichen Gehirns, der Funktionalität des Auges, der Synthese von Hormonen und anderer Signalstoffe, sowie die Vorbeugung von Herz-Kreislauf-Beschwerden, Krebs und Diabetes umfassen (Poulos, A Lipids 30:1-14, 1995; Horrocks, LA und Yeo
25 YK Pharmacol Res 40:21 1-225, 1999). Es besteht aus diesem Grund ein Bedarf an der Produktion mehrfach ungesättigter langkettiger Fettsäuren und speziell an ω -3-Fettsäuren.

30 So werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt, sowie zur ungehinderten Entwicklung des Säuglings..
Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie Mortierella oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Sonnen-

blume und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form ihrer Triacylglyceride anfallen. In höheren Pflanzen treten allerdings keine langkettigen ungesättigten Fettsäuren auf. Die langkettigen Fettsäuren stammen zum größten Teil aus Fischöl bzw. aus der Fermentation von entsprechenden Algen (z.B. Thraustochytrium) bzw. Pilzen (z.B. Mortierella). Die freien Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung hergestellt.

Je nach Anwendungszweck sind Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, so sind z.B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fettsäuren speziell mehrfach ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, da sie einen positiven Einfluss auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Möglichkeit einer Herzerkrankung haben. Sie finden in verschiedenen diätischen Lebensmitteln oder Medikamenten Anwendung.

Die beiden Fettsäuren γ -Linolensäure und Stearidonsäure, besonders die Stearidonsäure, haben vielfach beschrieben positive Auswirkungen auf den Hautstoffwechsel (z.B., Akne, Sonnenschäden) und auf die Verlangsamung der Hautalterungsprozesse, bis hin zu vorbeugender und heilender Wirkung bei den verschiedensten Entzündungsprozessen im Körper. Auch in der Begleittherapie von Prostata- und Darmkrebs und in Therapie und Vorbeugung von neurologischen Störungen (z.B. Dyspraxie, Schizophrenie) finden sie Anwendung. Deswegen spielen diese Fettsäuren auch in der Kosmetikindustrie und bei Nahrungsmittelzusätzen eine große Rolle. Bislang werden γ -Linolensäure- und Stearidonsäure-reiche Öl vor allem aus Arten der Gattung Echim gewonnen.

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 und seinem US-Äquivalent eine Δ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/1 1245 wird eine delta-15-Desaturase in WO 94/1 1516 wird eine Δ -12-Desaturase beansprucht. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-O 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-O 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659 beschrieben. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und charakterisieren sind (McKe-

on et al., Methods in Enzymol. 71, 1981 : 12141-12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792). In der Regel erfolgt die Charakterisierung membrangebundener Desaturasen durch Einbringung in einen geeigneten Organismus, der anschließend auf Enzymaktivität mittels Edukt- und Produktanalyse untersucht wird. Δ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393, WO 96/21022, WO0021557 und WO 99/271 11 beschrieben und auch die Anwendung zur Produktion in transgenen Organismen beschrieben wie in WO9846763 WO9846764, WO9846765. Dabei wird auch die Expression verschiedener Desaturasen wie in WO9964616 oder WO9846776 und Bildung polyungesättigter Fettsäuren beschrieben und beansprucht.

10 Nach wie vor besteht daher ein großer Bedarf an neuen und besser geeigneten Genen, die für Enzyme kodieren, die an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind und es ermöglichen, bestimmte Fettsäuren spezifisch in einem technischen Maßstab herzustellen, ohne dass unerwünschte Nebenprodukte entstehen. Bei der Auswahl von Biosynthesegenen sind vor allem zwei Merkmale besonders wichtig. Zum
15 einen besteht nach wie vor ein Bedarf an verbesserten Verfahren zur Gewinnung möglichst hoher Gehalte an polyungesättigten Fettsäuren. Zum anderen sollten die eingesetzten Enzyme hoch spezifisch für ein bestimmtes Substrat sein, da möglichst keine ungewünschten Nebenprodukte entstehen dürfen, die möglicherweise negative oder bisher nicht erforschte physiologische Effekte in der Nahrungsmittelanwendung
20 haben.

Um eine Anreicherung der Nahrung und des Futters mit diesen spezifisch hergestellten, mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu ermöglichen, besteht daher ein großer Bedarf an einem einfachen, kostengünstigen Verfahren zur Herstellung dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit Hilfe von möglichst spezifischen Enzymen, die an der
25 Fettsäurebiosynthese beteiligt sind.

Es bestand daher die Aufgabe ein neues Verfahren für die Herstellung von γ -Linolensäure und/oder Stearidonsäure in einer Pflanze zu entwickeln, dass möglichst spezifisch die Synthese dieser Fettsäuren erlaubt. Diese Aufgabe wurde durch das vorliegende Verfahren zur Herstellung von γ -Linolensäure (18:3 $\Delta^{6,9,12}$) oder Stearidonsäure (18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$) oder γ -Linolensäure (18:3 $\Delta^{6,9,12}$) und Stearidonsäure (18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$)
30 in transgenen Pflanzen der Familie Brassicaceae oder Linaceae gelöst, dadurch gekennzeichnet, dass die transgenen Pflanzen mindestens 10 Gew-% Ölsäure bezogen

auf den Gesamtfettsäuregehalt enthalten und das folgende Verfahrensschritte umfassend:

- 5 a) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz in die Ölpflanze, die für eine Δ -6-Desaturase aus einer Primula-Art codiert und als Substrat α -Linolensäure gegenüber Linolsäure bevorzugt, und
- b) Expression der durch die Nukleinsäure codierten Δ -6-Desaturase in der transgenen Pflanze, und
- c) Anzucht und Ernte der Pflanzen.

Vorteilhaft enthalten die transgenen Ölpflanzen der Familie der Brassicaceae oder
10 Linaceae mindestens 11, 12, 33, 14 oder 15 Gew-% Ölsäure, vorteilhaft mindestens 16, 17, 18, 19 oder 20 Gew-% Ölsäure bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt, besonders vorteilhaft mindestens 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 oder 60 Gew-% Ölsäure bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt, ganz besonders vorteilhaft mindestens 61,
15 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 oder 70 Gew-% Ölsäure bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt oder mehr. Für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhafte Pflanzen weisen außerdem einen bevorzugten Palmitinsäuregehalt von mindestens 9, 10, 11, 12, 13, 14 oder 15 Gew.-%, vorteilhaft von 20, 21, 22, 23, 24 oder 25 Gew-%, besonders vorteilhaft von 26, 27, 28, 29 oder 30 Gew-% bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt. Weitere vorteilhafte Pflanzen weisen einen Linolsäuregehalt von mindestens 20, 25, 30,
20 35, 40, 45 oder 50 Gew-%, vorteilhaft von 55, 60, 65, 70 oder 75 Gew-% bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt auf. Andere vorteilhafte Pflanzen weisen einen α -Linolensäuregehalt von mindestens 10, 15, 20, 25 oder 30 Gew.-%, vorteilhaft von 35, 40, 45 oder 50 Gew-%, besonders vorteilhaft von 55, 60, 65 oder 70 Gew.-% bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt auf, Vorteilhafte Pflanzen können auch Kombinationen der vor-
25 genannten Fettsäuren aufweisen, wobei der Gesamtfettsäuregehalt 100 Gew-% beträgt.

Die im Verfahren verwendeten transgenen Pflanzen der Familie Brassicaceae oder Linaceae haben vorteilhaft einen Gesamtölgehalt im Samen von mindestens 20, 25 oder 30 Gew-%, vorteilhaft um mindestens 35 oder 40 Gew-%, besonders vorteilhaft
30 um mindestens 45 oder 50 Gew-%, ganz besonders vorteilhaft von mindestens 55 Gew-% bezogen auf das Gesamtgewicht des Samens.

Im Verfahren bevorzugte ölfruchtpflanzen produzieren Öle, Lipide und/oder freie Fettsäuren, die weniger als 4, 3, 2 oder 1 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 0,9; 0,8; 0,7; 0,6 oder 0,5 Gew.-%, besonders vorteilhaft weniger als 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 oder 0,09 Gew.-% oder weniger Myristinsäure enthalten. Weitere vorteilhafte Ölfruchtpflanzen enthalten

5 weniger als 5, 4 oder 3 Gew.-% Palmitinsäure und/oder weniger als 2; 1,5 oder 1 Gew.-% Stearinsäure.

Vorteilhafte Ölpflanzen sollten neben einem hohen ölgehalt im Samen auch einen geringen Proteinanteil im Samen haben. Dieser Proteinanteil sollte möglichst geringer als 30, 25 oder 20 Gew.-%, vorteilhaft geringer als 19, 18, 17, 16 oder 15 Gew.-% sein.

- 10 Für das erfindungsgemäße Verfahren sind prinzipiell alle Gattungen der Familie Brassicaceae (ca. 380 Gattungen weltweit) mit ihren Unterfamilien Arabideae, Brassiceae, Chamireae, Cremolobeae, Heliophileae, Hesperideae, Lepidieae, Prynoglea, Schizopetaleae, Sisymbrieae, Stenopetaleae und Thelypodieae oder der Familie Linaceae (9 Gattungen weltweit) geeignet. Bevorzugt werden für das erfindungsgemäße Verfahren
- 15 Gattungen der Familien Brassicaceae oder Linaceae ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *Alliaria*, *Alyssoides*, *Arabis*, *Armoracia*, *Barbarea*, *Berteroa*, *Brassica*, *Camelina*, *Capsella*, *Cardamine*, *Cardaria*, *Cheiranthus*, *Crambe*, *Dentaria*, *Diploaxis*, *Erophila*, *Erysimum*, *Iberis*, *Lepidium*, *Lunaria*, *Nasturtium*, *Raphanus*, *Rorippa*, *Schivereckia*, *Sinapis*, *Sisymbrium*, *Thlaspi*, *Turritis*, *Anisadenia*, *Cliococca*, *Durandea*, *Hebepetalum*, *Hesperolinon*, *Hugonia*, *Indorouchera*, *Linum*, *Philbornea*, *Radiola*, *Reinwardtia*, *Roucheria*, *Sclerolinon* und *Tirpitzia*.
- 20

- Besonders bevorzugt für das erfindungsgemäße Verfahren werden die Gattungen und Arten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus *Alliaria petiolata*, *Alyssoides utriculata*, *Arabis caucasica*, *Arabis procurrens*, *Arabis turrata*, *Armoracia rusticana*, *Barbarea intermedia*, *Barbarea vulgaris*, *Berteroa incana*, *Brassica napus*, *Brassica napus* ssp. *rapifera*, *Brassica napus* ssp. *napus*, *Brassica nigra*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Brassica rapa* ssp. *oleifera*, *Brassica rapa* ssp. *rapa*, *Brassica sativus*, *Camelina sativa*, *Capsella bursa-pastoris*, *Cardamine amara*, *Cardamine bulbifera*, *Cardamine hirsuta*, *Cardamine pratensis*, *Cardaria draba*, *Cheiranthus cheiri*, *Crambe abyssinica*, *Dentaria bulbifera*, *Diploaxis tenuifolia*, *Erophila verna*, *Erophila verna* agg, *Erysimum bicolor*,
- 25 *Erysimum cheiranthoides*, *Iberis spec*, *Lepidium campestre*, *Lepidium sativum*, *Lepidium virginicum*, *Lunaria annua*, *Lunaria rediviva*, *Nasturtium officinale*, *Raphanus raphanistrum*, *Rorippa pyrenaica*, *Schivereckia podolica*, *Sinapis alba*, *Sinapis arven-*
- 30

sis, *Sisymbrium officinale*, *Thlaspi arvense*, *Thlaspi perfoliatum*, *Turritis glabra*, *Linum alpinum*, *Linum austriacum*, *Linum catharticum*, *Linum flavum*, *Linum grandiflorum*, *Linum hirsutum*, *Linum leonii*, *Linum maritimum*, *Linum ockendonii*, *Linum perenne*, *Linum tenuifolium*, *Linum viscosum* und *Linum usitatissimum*.

- 5 Besonders vorteilhaft werden die im Verfahren verwendeten Pflanzen ausgewählt aus der Gruppe der Ölpflanzen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Gattungen und Arten *Brassica campestris*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea*, *Camelina sativa*, *Crambe abyssinica* und *Linum usitatissimum*. Ganz besonders bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren die Gattungen und Arten *Brassica campestris*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea*, *Camelina sativa* und *Linum usitatissimum* verwendet.

Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren Nukleinsäuresequenzen verwendet, die für eine Δ -6-Desaturase aus *Primula*-Arten codieren, ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- 15 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 20 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide codieren, die auf Aminosäureebene mindestens 40 % Homologie mit SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 aufweisen und eine Δ -6-Desaturaseaktivität haben.

- Vorteilhaft werden im Verfahren zur Expression der unter (a), (b) und (c) genannten Nukleinsäuresequenzen diese funktionell mit einem Promotor oder Terminator oder Promotor und Terminator verbunden.

- Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von γ -Linolensäure und/oder Stearidonsäure in einer transgenen Pflanze der Familie Brassicaceae oder Linaceae wird durch die Aktivität der Δ -6-Desaturase der Gehalt an Δ -6-C₁₈-Fettsäuren gegenüber der nicht-transgenen Ausgangspflanze (Wildtyp) erhöht. Unter dem Begriff „erhöht“ im Sinne der Erfindung ist zu verstehen, dass der Gehalt an Δ -6-C₁₈-Fettsäuren (γ -

Linolensäure und/oder Stearidonsäure) gegenüber dem Wildtyp um mindestens 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 %, vorteilhaft um mindestens 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 oder 100 %, besonders vorteilhaft um mindestens 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 oder 150 % oder mehr erhöht wird.

- 5 Vorteilhaft weist die im Verfahren verwendete Δ -6-Desaturase eine Substratspezifität gegenüber α -Linolensäure auf, die um mehr als 20fach, vorteilhaft um mehr als 25, 30, 35 oder 40fach höher ist als die Substratspezifität gegenüber Linolsäure. In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung besitzt die Δ -6-Desaturase eine ausschließliche Substratspezifität gegenüber α -Linolensäure, das heißt das Enzym
- 10 erkennt als Substrat nur α -Linolensäure nicht jedoch Linolsäure. Dies führt zu einer vorteilhaften Synthese von ungesättigten Fettsäuren des ω -3-Syntheseweges, während Linolsäure als Startsubstrat des ω -6-Syntheseweges von der Desaturase nicht umgesetzt wird.

- Vorteilhaft werden γ -Linolensäure und/oder Stearidonsäure als Produkte der enzymatischen Aktivität der Δ -6-Desaturase im Verfahren im Samen der Ölpflanzen angereichert.
- 15

Die im Verfahren hergestellten Fettsäuren γ -Linolensäure und/oder Stearidonsäure fallen vorteilhaft als freie Fettsäuren oder bevorzugt in Form von Estern bevorzugt in Form der Triglyceride an.

- 20 Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an den ungesättigten Fettsäuren γ -Linolensäure und/oder Stearidonsäure, indem man Triglyceride mit gesättigten oder ungesättigten oder gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit mindestens dem Protein, das durch die Sequenz SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 kodiert wird, inkubiert.
- 25 Vorteilhaft wird das Verfahren in Gegenwart von Verbindungen durchgeführt, die Reduktionsäquivalente aufnehmen oder abgeben können. Anschließend können die Fettsäuren aus den Triglyceriden freigesetzt werden.

- Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren transgene Pflanzen der Familie Brassicaceae oder Linaceae verwendet. Diese Pflanzen enthalten die im erfindungsgemäßen Verfahren synthetisierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren γ -Linolensäure und/oder Stearidonsäure und können vorteilhaft direkt vermarktet werden ohne dass, die synthetisierten Öle, Lipide oder Fettsäuren isoliert werden müssen. Unter Pflanzen
- 30

- im erfindungsgemäßen Verfahren sind ganze Pflanzen sowie alle Pflanzenteile, Pflanzenorgane oder Pflanzenteile wie Blatt, Stiel, Samen, Wurzel, Knollen, Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotelydonen, 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 Pflanzen in Form ihrer Öle, Fett, Lipide und/oder freien Fettsäuren isoliert werden. Durch dieses Verfahren hergestellte mehrfach ungesättigten Fettsäuren lassen sich durch Ernten der Pflanzen 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 warmen Hexan extrahiert werden. Anschließend wird das Lösungsmittel wieder entfernt. 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 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 noch desodoriert.
- Die im Verfahren hergestellten PUFAs fallen in den Pflanzen vorteilhaft in Form ihrer Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon an.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung des Öls, Lipids, der Fettsäuren und/oder der Fettsäurezusammensetzung, die durch das Mischen der hergestellten Öle, Lipide oder Fettsäuren mit anderen tierischen, mikrobiellen oder

pflanzlichen Ölen hergestellt wurden, in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

- 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, α -Linolensäure, γ -Linolensäure und/oder Stearidonsäure 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 Gew.-% oder mehr. Zur Bestimmung kann z.B. der Anteil an Fettsäure nach Überführung der Fettsäuren in die Methylester durch Umesterung gaschromatographisch bestimmt werden. Das Öl, Lipid oder Fett kann verschiedene andere gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, z.B. Palmitin-, Palmitolein-, Stearin-, Ölsäure etc., enthalten. Insbesondere kann je nach Ausgangsorganismus der Anteil der verschiedenen Fettsäuren in dem Öl oder Fett schwanken.
- Bei den im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigte Fettsäuren, handelt es sich beispielsweise um Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide, Monoacylglycerin, Diacylglycerin, Triacylglycerin oder sonstige Fettsäureester.

Aus den so im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigte Fettsäuren lassen sich die enthaltenden Fettsäuren beispielsweise über eine Alkalibehandlung beispielsweise wässrige KOH oder NaOH oder saure Hydrolyse vorteilhaft in Gegenwart eines Alkohols wie Methanol oder Ethanol oder über eine enzymatische Abspaltung freisetzen und isolieren über beispielsweise Phasentrennung und anschließender Ansäuerung über z.B. H_2SO_4 . Die Freisetzung der Fettsäuren kann auch direkt ohne die vorhergehend beschriebene Aufarbeitung erfolgen.

- Aus den Pflanzen werden nach Anzucht die Öle, Lipide oder Fettsäuren in üblicher Weise gewonnen. Hierzu können wie beschrieben die Pflanzen und/oder deren Samen nach Ernte zunächst aufgeschlossen werden oder direkt verwendet werden. Die Öle, Lipide und/oder Fettsäuren werden vorteilhaft mit geeigneten Lösungsmitteln wie apolare Lösungsmittel wie Hexan oder Ethanol, Isopropanol oder Gemischen wie Hexan/Isopropanol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol bei Temperaturen zwischen $0^{\circ}C$ bis $80^{\circ}C$, bevorzugt zwischen $20^{\circ}C$ bis $50^{\circ}C$ extrahiert. Die Biomasse wird in der Regel mit einem Überschuss an Lösungsmittel extrahiert beispielsweise einem Überschuss von Lösungsmittel zu Biomasse von 1:4. Das Lösungsmittel wird anschließend

beispielsweise über eine Destillation entfernt. Die Extraktion kann auch mit superkritischem CO_2 erfolgen. Nach Extraktion kann die restliche Biomasse beispielsweise über Filtration entfernt werden.

Das so gewonnene Rohöl kann anschließend weiter aufgereinigt werden, beispielsweise in dem Trübungen über das Versetzen mit polaren Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform und anschließender Filtration oder Zentrifugation entfernt werden. Auch eine weitere Reinigung über Säulen ist möglich.

Zur Gewinnung der freien Fettsäuren aus den Triglyceriden werden diese, wie beschrieben, in üblicherweise verseift.

Die so im Verfahren gewonnenen Öle, Lipide und/oder freien Fettsäuren oder die Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an γ -Linolensäure und/oder Stearidonsäure, die nach den oben genannten Verfahren hergestellt wurden, können zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter, Kosmetika oder Pharmazeutika verwendet werden. Hierzu werden diese den Nahrungsmitteln, dem Tierfutter, den Kosmetika oder Pharmazeutika in üblichen Mengen zugesetzt. In einer anderen Ausführungsform werden die Öle, Lipide und/oder freien Fettsäuren oder die Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an γ -Linolensäure und/oder Stearidonsäure mit anderen tierischen, mikrobiellen oder pflanzlichen Ölen, Lipiden oder Fettsäuren zu Fettsäurezusammensetzungen gemischt. Diese können Nahrungsmitteln, dem Tierfutter, den Kosmetika oder Pharmazeutika in üblichen Mengen zugesetzt werden.

Die oben genannten Verfahren ermöglichen vorteilhaft die Synthese von Fettsäuren oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an Fettsäuren mit Δ -6-Doppelbindungen vorteilhaft an C18-Fettsäuren.

Das oben genannte Verfahren ermöglicht vorteilhaft die Synthese von Fettsäuren oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an Fettsäuren mit Δ -6-Doppelbindungen, wobei als Substrat für die Reaktion der Δ -6-Desaturase bevorzugt Linolsäure und/oder α -Linolensäure vorteilhaft nur α -Linolensäure verwendet wird. Damit ermöglicht das oben genannte Verfahren vorteilhaft besonders die Synthese von γ -Linolensäure und/oder Stearidonsäure bevorzugt nur von Stearidonsäure. Diese spezielle Substratspezifität der erfindungsgemäßen Δ -6-Desaturase unterscheidet sich vorteilhaft von den Substratspezifitäten der Δ -6-Desaturasen des Standes der Technik.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind somit isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -6-Desaturaseaktivität codieren und wobei die codierte Δ -6-Desaturase als Substrat α -Linolensäure gegenüber Linolsäure bevorzugt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- 5 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 10 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide codieren, die auf Aminosäureebene mindestens 95 % Homologie mit SEQ ID NO: 2 aufweisen oder Derivate der in SEQ ID NO: 3 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide codieren, die auf Aminosäureebene mindestens 80 % Homologie mit SEQ ID NO: 4 aufweisen und die eine Δ -6-
15 Desaturaseaktivität haben.

Die gefundenen Δ -6-Desaturasen unterscheiden sich von den bereits beschriebenen Δ -6-Desaturasen durch wesentlich unterschiedliche Nukleotid- und Aminosäuresequenzen. Die Primula-Sequenz von *P. cortusoides* zeigt zu den Δ -6-Desaturase-Sequenzen des Standes der Technik eine 78 %ige Ähnlichkeit auf Aminosäure-Ebene. Die erfindungsgemäße Δ -6-Desaturase-Sequenz von *P. lutoides* hat eine 92%ige Ähnlichkeit auf Aminosäure-Ebene zu den Sequenzen des Standes der Technik.

Vorteilhaft stammen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen aus einer Pflanze, bevorzugt aus einer Pflanze der Familie der Primulaceae, besonders bevorzugt aus der Gattung *Primula*, ganz besonders bevorzugt aus den Gattungen und Arten *Primula cortusoides* oder *Primula lutoides*.

Der Begriff " Δ -6-Desaturase" im Sinne der Erfindung umfasst Proteine, die an der Desaturierung von Fettsäuren vorteilhaft von Fettsäuren, die an Position 9 der Fettsäurekette eine Doppelbindung haben, teilnehmen, sowie ihre Homologen, Derivaten oder Analoga.

Bei einer weiteren Ausführungsform kodieren Derivate des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls wieder gegeben in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 Proteine mit mindestens 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% oder 90 %, vor-
teilhaft mindestens 91% oder 92%, vorzugsweise mindestens 93% oder 94% und stär-
ker bevorzugt mindestens 95% oder 96% und am stärksten bevorzugt mindestens et-
wa 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie (= Identität) zur vollständigen Aminosäu-
resequenz SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4. Die Homologie wurde über den gesam-
ten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für die Sequenzver-
gleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987,
10 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 Compu-
ter Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 5371 1 (1991)] enthalten sind.
Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Pro-
gramm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt:
15 Gap Weight: 8, Length Weight: 2, Average Match: 2,912 und Average Mismatch: -
2,003.

Die Erfindung umfasst zudem Nukleinsäuremoleküle, die sich von einer der in SEQ ID
NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 gezeigten Nukleinsäuresequenz (und Teilen davon) auf-
20 grund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden und somit die gleiche Δ -6-
Desaturase kodieren wie diejenige, die von der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3
gezeigten Nukleotidsequenz kodiert wird.

Zusätzlich zu der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 gezeigten Δ -6-Desaturase-
Nukleotidsequenz erkennt der Fachmann, dass DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu
25 Änderungen in den Aminosäuresequenzen der Δ -6-Desaturase führen, innerhalb einer
Population existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im Δ -6-Desaturase-
Gen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund von natürlicher
Variation existieren. Diese natürlichen Varianten bewirken üblicherweise eine Varianz
von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz des Δ -6-Desaturase-Gens. Sämtliche und alle
30 dieser Nukleotidvariationen und daraus resultierende Aminosäurepolymorphismen in
der Δ -6-Desaturase, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die funktionelle
Aktivität der Δ -6-Desaturase nicht verändern, sollen im Umfang der Erfindung enthalten
sein.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz (oder Fragmente davon können vorteilhaft zur Isolierung weiterer genomischer Sequenzen über Homologiescreening verwendet werden.

Die genannten Derivate lassen sich beispielsweise aus anderen Organismen eukaryontischen Organismen wie Pflanzen wie speziell Moosen, Dinoflagellaten oder Pilze isolieren. Vorteilhaft lassen sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und Derivate aus Pflanzen isolieren.

Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine erhalten bleibt.

Solche DNA-Sequenzen lassen sich ausgehend von den in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 beschriebenen DNA-Sequenz oder Teilen dieser Sequenzen, beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Eukaryonten wie beispielsweise den oben genannt isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den genannten Sequenzen. Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide beispielsweise der konservierten Bereiche, die über Vergleiche mit anderen Desaturasegenen in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Vorteilhaft werden die Histidin-Box-Sequenzen verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure: Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wässrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 X SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x SSC, 50 % Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 45°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die

Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 55°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik wie beispielsweise Sambrook et al., „Molecular Cloning“, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Harnes and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Weiterhin sind unter Derivaten Homologe der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 beispielsweise eukaryontische Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen.

Außerdem sind unter Homologen der Sequenz SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Diese Varianten können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne dass aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

Unter Derivaten sind auch vorteilhaft Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich - 1 bis -2000 vor dem Startkodon so verändert wurden, dass die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird. Weiterhin sind unter Derivaten auch Varianten zu verstehen, die am 3'-Ende verändert wurden.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, die für eine Δ -6-Desaturase kodieren, können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung

aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Δ -6-Desaturase-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Codons erzeugt, die von den entsprechenden Wirtsorganismen beispielsweise Pflanzen bevorzugt werden. Dies führt in der Regel zu einer optimalen Expression der heterologen Gene. Diese von Pflanzen bevorzugten Codons können aus Codons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Ein Beispiel für *Corynebacterium glutamicum* ist gegeben in: Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:21 11-21 18). Die Durchführung solcher Experimente sind mit Hilfe von Standardmethoden durchführbar und sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für die Δ -6-Desaturase-Gene kodieren, sind solche Derivate der erfindungsgemäßen Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen, das heißt die wesentliche enzymatische Aktivität und spezifische Selektivität der Proteine besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Codon-Gebrauch einer Pflanze angepasste, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Gehaltes von Δ -6-Doppelbindungen in Fettsäuren, Ölen oder Lipiden in der Pflanze durch Überexpression des/der Δ -6-Desaturase-Gens/Gene in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, Δ -6-Desaturase-Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Mögliche Techniken zur in vitro-Evolution von DNA zur Veränderung bzw. Verbesserung der DNA-Sequenzen sind beschrieben bei Patten, P.A. et al., *Current Opinion in Biotechnology* 8, 724-733(1997) oder bei Moore, J.C. et al., *Journal of Molecular Biology* 272, 336-347 (1997). Besonders geeignet sind codierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten werden. Die spezifische Kodon -Nutzung kann ein mit pflanzen genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein Δ -6-Desaturase-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität
5 sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf Δ -6-Desaturase-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signalsequenz für das ER, das das Δ -6-Desaturase-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Vorteilhaft stammen die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen aus
10 einer Pflanze wie einer monokotylen oder dikotylen Pflanze. Bevorzugt stammen die Nukleinsäuresequenzen aus der Familie der Primulaceae, wie oben beschrieben.

Vorteilhaft können die Δ -6-Desaturase-Gene im erfindungsgemäßen Verfahren mit weiteren Genen der Fettsäurebiosynthese kombiniert werden. Beispiele für derartige Gene sind die Acyltransferasen, weitere Desaturasen oder Elongasen. Für die in vivo
15 und speziell in vitro Synthese ist die Kombination mit z.B. NADH-Cytochrom B5 Reduktasen vorteilhaft, die Reduktionsäquivalente aufnehmen oder abgeben können.

Im Prinzip können alle Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels mit der(den) erfind-
erischen Δ -6-Desaturase(n) [im Sinne dieser Anmeldung soll der Plural den Singular und umgekehrt beinhalten] zur Herstellung von γ -Linolensäure und/oder Stearidonsäure
20 re im Verfahren kombiniert werden vorteilhaft werden Gene 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-CoA-Lysophospholipid-Acyltransferasen, Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym
25 A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) verwendet. Besonders bevorzugt werden Gene ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Δ -4-Desaturasen, Δ -5-Desaturasen, Δ -9-Desaturasen, Δ -12-Desaturasen, Δ -6-Elongasen oder Δ -5-Elongasen in Kombination
30 tion mit den vorgenannten Genen für die Δ -6-Desaturase(n) verwendet, wobei einzelne Gene oder mehrere Gene in Kombination verwendet werden können.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand sind Proteine, die durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen codiert werden.

Unter den erfindungsgemäßen Proteinen (= Polypeptide oder Aminosäuresequenzen) sind Proteine zu verstehen, die eine in der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenz oder eine daraus durch Substitution, Inversion, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhaltliche Sequenz 5 enthalten, wobei die enzymatische Aktivitäten des in SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 dargestellten Proteins erhalten bleibt bzw. nicht wesentlich reduziert wird. Unter nicht wesentlich reduziert sind alle Enzyme zu verstehen, die noch mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % der enzymatischen Aktivität des Ausgangsenzyms aufweisen. Dabei können beispielsweise bestimmte Aminosäuren durch solche 10 mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität etc.) ersetzt werden. Beispielsweise werden Argininreste gegen Lysinreste, Valinreste gegen Isoleucinreste oder Asparaginsäurereste gegen Glutaminsäurereste ausgetauscht. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge vertauscht, hinzugefügt oder entfernt werden, oder es können mehrere dieser Maßnahmen 15 miteinander kombiniert werden.

Unter Derivaten sind auch funktionelle Äquivalente zu verstehen, die insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für Δ -6-Desaturase codierende Sequenz beinhalten, welche weiterhin die gewünschte Funktion, das heißt deren enzymatische Aktivität und Substratselektivität nicht wesentlich 20 reduziert ist, zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation der Δ -6-Desaturase Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen 25 codierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt (= nicht wesentlich reduziert) oder verstärkt ist (= Enzymaktivität stärker als die Aktivität des Ausgangsenzym, das 30 heißt Aktivität ist höher als 100 %, bevorzugt höher als 110 %, besonders bevorzugt höher als 130 %).

Die Nukleinsäuresequenz kann dabei vorteilhaft beispielsweise eine DNA- oder cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt geeignete codie-

rende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine Δ -6-Desaturase mit den oben beschriebenen Sequenzen kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Doppelbindungen in Δ -6-Position verleihen, besonders wenn dabei ω 3 Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen hergestellt werden. Diese Sequenzen können homologen oder heterologen Ursprungs sein.

Unter dem erfindungsgemäßen Genkonstrukt (= Expressionskassette, Nukleinsäurekonstrukt oder -fragment) sind die in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 genannten Sequenzen zu verstehen, die sich als Ergebnis des genetischen Codes ergeben, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden und welche die Expression der codierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtspflanze 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. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte „enhancer Sequenzen“ funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder

Terminatoren. Das Δ -6-Desaturase-Gen kann in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein.

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 werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

- 10 Als Promotoren in der Expressionskassette sind grundsätzlich alle Promotoren geeignet, die die Expression von Fremdgenen in Organismen vorteilhaft in Pflanzen oder Pilzen steuern können. Vorzugsweise verwendet man insbesondere ein pflanzliche Promotoren oder Promotoren, die aus einem Pflanzenvirus entstammen. Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in
- 15 Promotoren wie *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *trp-tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lpp-lac*-, *lacI^q* 17-, T5-, T3-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, SP6-, λ -P_R- oder im λ -P_L-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gramnegativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren *amy* und *SPO2*, in den Hefe- oder Pilzpromotoren *ADC1*, *MFa*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* oder in
- 20 den Pflanzenpromotoren wie *CaMV/35S* [Franck et al., *Cell* 21(1980) 285-294], *SSU*, *OCS*, *lib4*, *STLS1*, *B33*, *nos* (= Nopalinsynthase Promotor) oder im Ubiquitin-Promotor enthalten. Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen Δ -6-Desaturase-Gens in den Organismen vorteilhaft in den Pflanzen zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert
- 25 werden kann. Derartige vorteilhafte Pflanzenpromotoren sind beispielsweise der *PRP1*-Promotor [Ward et al., *Plant.Mol. Biol.*22(1993), 361-366], ein durch Benzensulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) *Plant J.* 2,397-404), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) bzw. ein durch
- 30 Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO93/21 334) Promotor. Weitere Pflanzenpromotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel, der *ST-LSI* Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., *EMBO J.* 8 (1989) 2445-245), der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus *Glycine max* (siehe auch Genbank Accession Nummer U87999) oder ein Nodien-spezifischen

Promotor wie in EP 249676 können vorteilhaft verwandt werden. Vorteilhaft sind insbesondere solche pflanzliche Promotoren, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen/-organen sicherstellen, in denen die Fettsäurebiosynthese bzw. dessen Vorstufen stattfindet wie beispielsweise im Endosperm oder im sich entwickelnden Embryo.

5 Insbesondere zu nennen sind vorteilhafte Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten wie beispielsweise der USP-Promotor oder Derivate davon, der LEB4-Promotor, der Phaseolin-Promotor oder der Napin-Promotor. Der erfindungsgemäß aufgeführte und besonders vorteilhafte USP-Promotor oder dessen Derivate vermitteln in der Samenentwicklung eine sehr früh Genexpression (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459-67).

10 Weitere vorteilhafte samenspezifische Promotoren, die für monokotyle und dikotyle Pflanzen verwendet werden können, sind die für Dikotyle geeignete Promotoren wie ebenfalls beispielhaft aufgeführte Napingen-Promotor aus Raps (US5,608,152), der Oleosin-Promotor aus Arabidopsis (WO98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US5,504,200), der

15 Bce4-Promotor aus Brassica (WO9 1/1 3980) oder der Leguminosen B4-Promotor (LeB4, Baeumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992: 233 - 239) oder für Monokotyle geeignete Promotoren wie die Promotoren des Ipt2- oder Ipt1-Gens aus Gerste (WO95/15389 und WO95/23230) oder die Promotoren des Gersten Hordein-Gens, des Reis Glutelin-Gens, des Reis Oryzin-Gens, des Reis Prolamin-Gens, des Weizen

20 Gliadin-Gens, des Weizen Glutelin-Gens, des Mais Zein-Gens, des Hafer Glutelin-Gens, des Sorghum Kasirin-Gens oder des Roggen Secalin-Gens, die in WO99/16890 beschrieben werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von

25 Fettsäuren, Ölen und Lipiden bzw. deren Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor des Napin-Gens aus Raps (US 5,608,152), des USP-Promotor aus Vicia faba (USP = unbekanntes Samenprotein, Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459-67), des Oleosin-Gens aus Arabidopsis (WO98/45461), des Phaseolin-

30 Promotors (US 5,504,200) oder der Promotor des Legumin B4-Gens (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2): 233-9). Weiterhin sind zu nennen Promotoren, wie der des Ipt2 oder Ipt1 -Gens aus Gerste (WO95/15389 und WO95/23230), die in monokotylen Pflanzen samenspezifische Expression vermitteln.

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben (Rogers et

al. (1987) Method in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Im Genkonstrukt (= Expressionskassette, Nukleinsäurekonstrukt) können wie oben beschrieben noch weitere Gene, die in die Organismen eingebracht werden sollen, 5 enthalten sein. Diese Gene können unter getrennter Regulation oder unter der gleichen Regulationsregion wie das Δ -6-Desaturase-Gen liegen. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um weitere Biosynthesegene vorteilhaft der Fettsäurebiosynthese wie Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels, die eine gesteigerte Synthese ermöglichen, ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl- 10 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-Acetylasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder 15 Fettsäure-Elongase(n). Beispielsweise seien die Gene für die Δ -15-, Δ -12-, Δ -9-, Δ -6-, Δ -5-Desaturase, β -Ketoacyl-Reductasen, β -Ketoacyl-Synthasen, Elongasen oder die verschiedenen Hydroxylasen und Acyl-ACP-Thioesterasen genannt. Vorteilhaft werden Desaturase- und Elongasegene im Nukleinsäurekonstrukt verwendet. Besonders vorteilhaft werden Gene ausgewählt aus der Gruppe Δ -4-Desaturase, Δ -5- 20 Desaturase, Δ -8-Desaturase, Δ -9-Desaturase, Δ -12-Desaturase, Δ -5-Elongase, Δ -6-Elongase oder Δ -9-Elongase im Konstrukt verwendet.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für die erfindungsgemäße Expressionskassette und das erfindungsgemäße Verfahren, wie unten beschrieben, verwendet werden. Darüber hinaus können 25 auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente (= erfindungsgemäße Nukleinsäuren) miteinander 30 können an die Fragmente Adaptern oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der

Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zum Wirtsorganismus beispielsweise zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-
5 Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz, die für ein Δ -6-Desaturase-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, -primerrepair-, Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, -chewing-back- oder Auffüllen von Überhängen für -bluntends-, können komplementäre
15 Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für eine vorteilhafte hohe Expression kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER
20 lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-
25 Plasmids pTiACH 5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J.3 (1984), 835 ff) oder entsprechende funktionelle Äquivalente.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Δ -6-Desaturase-DNA-Sequenz sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al.,
30

Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben werden.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adap-
5 toren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allge-
10 meinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine
15 DNA-Sequenz die für ein Δ -6-Desaturase-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adap-
20 toren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allge-
25 meinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine
30 DNA-Sequenz die für ein Δ -6-Desaturase-Gen codiert und eine Region für die

transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Die DNA Sequenzen codierend für zwei Δ -6-Desaturasen aus *Primula cortusoides* oder *Primula lutoidea* beinhaltet alle Sequenzmerkmale, die notwendig sind, um eine dem Ort der Fettsäure-, Lipid- oder Ölbiosynthese korrekte Lokalisation zu erreichen. Daher sind keine weiteren Targetingsequenzen per se notwendig. Allerdings kann eine solche Lokalisation wünschenswert und vorteilhaft sein und daher künstlich verändert oder verstärkt werden, sodass auch solche Fusionskonstrukte eine bevorzugte vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung sind.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in Plastiden gewährleisten. Unter bestimmten Umständen kann auch ein Targeting in andere Kompartimente (referiert: Kermode, *Cht. Rev. Plant Sci.* 15, 4 (1996), 285-423) z.B. in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER), Peroxisomen, Lipidkörper oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen ein Verbleib im Kompartiment des Zytosols, dem Zytosol, wünschenswert sein.

Vorteilhafterweise werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen zusammen mit mindestens einem Reportergen in eine Expressionskassette moniert, die in den Organismus über einen Vektor oder direkt in das Genom eingebracht wird. Dieses Reporter-gen sollte eine leichte Detektierbarkeit über einen Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenzassay oder über eine photometrische Messung ermöglichen. Beispielfhaft seien als Reportergene Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene, Hydrolasegene, Fluoreszenzproteingene, Biolumineszenzgene, Zucker- oder Nukleotidstoffwechselgene oder Biosynthesegene wie das Ura3-Gen, das *llv2*-Gen, das Luciferasegen, das α -Galactosidasegen, das *gfp*-Gen, das 2-Desoxyglucose-6-phosphat-Phosphatasegen, das β -Glucuronidase-Gen, β -Lactamasegen, das Neomycinphosphotransferasegen, das Hygromycinphosphotransferasegen oder das BASTA (= Gluphosinatresistenz)-Gen genannt. Diese Gene ermöglichen eine leichte Messbarkeit und Quantifizierbarkeit der Transkriptionsaktivität und damit der Expression der Gene. Damit lassen sich Genomstellen identifizieren, die eine unterschiedliche Produktivität zeigen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der codierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regu-

latorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden codierenden Sequenz für die Δ -6-Desaturase und/oder Δ -6-Desaturase DNA Sequenz operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, codierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente

5 derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der codierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation in Plastiden. Aber auch Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (= ER),

10 im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten sind bei Bedarf einsetzbar sowie Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -871 1).

Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den USP- oder Napin-Promotor), das zu exprimierende Gen und das ER-

15 Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Das Genkonstrukt wird zur Expression in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus beispielsweise einem Mikroorganismus wie einem Pilz oder einer Pflanze vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid,

20 einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirtsorganismus ermöglicht. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR-Serie wie z.B. pBR322, pUC-Serie wie pUC18 oder pUC19, M113mp-Serie, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-MI¹¹³-B1, λ gt11 oder pBdCl, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder

25 pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, weitere vorteilhafte Pilzvektoren werden von Romanos, M.A. et al., [(1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8: 423-488] und von van den Hondel, C.A.M.J.J. et al. [(1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi] sowie in *More Gene Manipulations in Fungi* [J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., p. 396-428: Academic Press: San Diego] und in "Gene transfer Systems and vector development for filamentous fungi", [van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J.F. et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge] beschrieben. Vorteilhafte Hefepromotoren sind beispielsweise 2μ M, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLye23. Beispiele für

30

Algen- oder Pflanzenpromotoren sind pLGV23, pGHlac⁺, pBIN19, pAK2004, pVKH oder pDH51 (siehe Schmidt, R. and Willmitzer, L., 1988). Die oben genannten Vektoren oder Derivate der vorstehend genannten Vektoren stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und
5 können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P.H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Geeignete pflanzliche Vektoren werden unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben. Vorteilhafte Vektoren sind sog. shuttle-Vektoren oder binäre Vektoren, die in E. coli und Agrobacterium replizieren.
10

Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder
15 chromosomal repliziert werden bevorzugt ist eine chromosomale Replikation.

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann die erfindungsgemäße Expressionskassette auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus der Expressionskassette als Vektor oder den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bestehen.
20

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform kann die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

Sollen neben der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz weitere Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen mit einem Reporter gen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen mit einem Reporter gen in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können.
25

Der Vektor enthält vorteilhaft mindestens eine Kopie der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen und/oder des erfindungsgemäßen Genkonstruktes.
30

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Transformationsvektor pRT ((a) Toepfer et al., 1993, *Methods Enzymol.*, 217: 66-78; (b) Toepfer et al. 1987, *Nucl. Acids. Res.* 15: 5890 ff.) eingebaut werden.

5 Alternativ kann ein rekombinanter Vektor (= Expressionsvektor) auch in-vitro transkribiert und translatiert werden, z.B. durch Nutzung des T7 Promotors und der T7 RNA Polymerase.

In Prokaryoten verwendete Expressionsvektoren nutzen häufig induzierbare Systeme mit und ohne Fusionsproteinen bzw Fusionsoligopeptiden, wobei diese Fusionen sowohl N-terminal als auch C-terminal oder anderen nutzbaren Domänen eines Proteins
10 erfolgen können. Solche Fusionsvektoren dienen in der Regel dazu: i.) die Expressionsrate der RNA zu erhöhen ii.) die erzielbare Proteinsyntheserate zu erhöhen, iii.) die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen, iv.) oder die Reinigung durch einen für die Affinitätschromatographie nutzbare Bindesequenz zu vereinfachen. Häufig werden auch proteolytische Spaltstellen über Fusionsproteine eingeführt, was die Abspaltung eines
15 Teils des Fusionsproteins auch der Reinigung ermöglicht. Solche Erkennungssequenzen für Proteasen erkennen sind z.B. Faktor Xa, Thrombin und Enterokinase.

Typische vorteilhafte Fusions- und Expressionsvektoren sind pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67: 31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) welches Glutathion S-transferase beinhaltet (GST), Maltose Bindeprotein, oder Protein A.
20

Weitere Beispiele für E. coli Expressionsvektoren sind pTrc [Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315] und pET Vektoren [Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89; Stratagene, Amsterdam, Niederlande].

25 Weitere vorteilhafte Vektoren zur Verwendung in Hefe sind pYepSed (Baldari, et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Ce//* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) *Gene* 54:1 13-123), and pYES-Derivate (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren für die Nutzung in filamentösen Pilzen sind beschrieben in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer Systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.
30

Alternativ können auch vorteilhaft Insektenzelleexpressionsvektoren genutzt werden z.B. für die Expression in Sf 9 Zellen. Dies sind z.B. die Vektoren der pAc Serie (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) und der pVL series (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

- 5 Des weiteren können zur Genexpression vorteilhaft Pflanzenzellen oder Algenzellen genutzt werden. Beispiele für Pflanzenexpressionsvektoren finden sich in Becker, D., et al. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197 oder in Bevan, M.W. (1984) "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", *Nucl. Acid. Res.* 12: 8711-8721 .

- 10 Weitere prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.*

- 15 Das Einbringen der erfindungsgemäßen Nucleinsäuren, der Expressionskassette oder des Vektors in Organismen beispielsweise in Pflanzen kann prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

- Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., *DNA Cloning Vol.1*, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Guthrie et al. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, 1994, Academic Press entnehmen.
- 20

- Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind
- 30 beispielsweise in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*,

Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 871 1). Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* wird beispielsweise von Höfgen und Willmitzer in Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 beschrieben oder ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind wie vorher beschrieben vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* und Übertragung von entsprechenden rekombinanten Ti-Plasmiden oder Ri-Plasmiden durch oder durch Infektion mit transgenen Pflanzenviren durchgeführt werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985) Science 225: 1229f).

Werden Agrobakterien verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: Shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit

der einzuführenden Expressionskassette verbunden.

Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobacterium transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter Agrobakteria und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA).

Mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie Arabidopsis oder Kulturpflanzen wie Canola, Flachs oder Raps verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Besonders zur Herstellung von γ -Linolensäure und/oder Stearidonsäure eignen sich Pflanzen der Familien der Brassicaceae oder Linaceae. Besonders vorteilhaft eignet sich die Gattung Brassica, Camelina oder Linum zur Herstellung von γ -Linolensäure und/oder Stearidonsäure mit dem erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen vorteilhaft in Kombination mit weiteren Desaturasen und Elongasen.

Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden Organismus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA

der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, das eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, das Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S.128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225). Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:871-1f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden.

Dem Fachmann sind auch Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992) Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet. Entsprechende weitere Methoden können den oben genannten Schriften von S.D.

Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Als transgene Organismen bzw. Wirtsorganismen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure, die Genkonstrukte oder den Vektor eignen sich prinzipiell vorteilhaft alle Pflanzen der Familien Brassicaceae oder Linaceae, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielhaft seien Pflanzen wie Arabidopsis, Raps, Camelina, Senf oder Flachs genannt. Bevorzugt werden Pflanzen, die natürlicherweise öle in größeren Mengen synthetisieren können.

Unter transgener Pflanze im Sinne der Erfindung ist zu verstehen, dass die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren nicht an ihrer natürlichen Stelle im Genom der Pflanze 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 der Pflanze sind, dass jedoch die Sequenz gegenüber der natürlichen Sequenz verändert wurde und/oder dass die Regulationssequenzen, der natürlichen Sequenzen verändert wurden. Bevorzugt ist unter transgen die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an nicht natürlicher Stelle im Genom zu verstehen, das heißt eine homologe oder bevorzugt heterologe Expression der Nukleinsäuren liegt vor.

"Transgen" meint damit beispielsweise bezüglich einer Nukleinsäuresequenz, einem Genkonstrukt oder einem Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die für die Δ -6-Desaturase oder deren Derivate codiert, oder einem Organismus transformiert mit dieser Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustande gekommenen Konstruktionen, in denen sich entweder

- a) die Δ -6-Desaturase-Nukleinsäuresequenz, oder
- b) eine mit der Δ -6-Desaturase-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 beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleo-

5 tidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomal-
malen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen
Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umge-
bung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Um-
gebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Se-
quenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevor-
zugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp.

10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskas-
sette enthaltend DNA-Sequenzen codierend für ein Δ -6-Desaturase-Gen oder mit die-
sen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzenzellen, -
geweben oder Pflanzenteilen. Ziel der Verwendung ist die Erhöhung des Gehaltes an
Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit erhöhtem Gehalt an und Doppelbindungen in Δ -6-
Position.

15 Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression des Δ -6-Desaturase-Gens
spezifisch in den Blättern, in den Samen, den Knollen oder anderen Teilen der Pflanze
erfolgen. Solche Fettsäuren, Öle oder Lipide mit Δ -6-Doppelbindungen überproduzie-
renden transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -
gewebe oder -teile, sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ein be-
vorzugter erfindungsgemäßer Gegenstand sind transgene Pflanzen der Familien Bras-
sicaeae oder Linaceae enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, ein
20 erfindungsgemäßes Genkonstrukt oder einen erfindungsgemäßen Vektor.

25 Erhöhung des Gehaltes von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Δ -6-Doppelbindungen
bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung beispielsweise die künstlich erworbe-
ne Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung durch funktionelle Überexpression des
 Δ -6-Desaturase-Gens/der Δ -6-Desaturase-Gene (im Sinne der Erfindung soll der Sin-
gular den Plural mit umfassen und umgekehrt) in den erfindungsgemäßen transgenen
Pflanzen gegenüber den nicht gentechnisch modifizierten Ausgangspflanzen zumin-
dest für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

30 Der Biosyntheseort von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden beispielsweise ist im allgemei-
nen der Samen oder Zellschichten des Samens, so dass eine samenspezifische Ex-
pression des Δ -6-Desaturase-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, dass die
Biosynthese von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden nicht auf das Samengewebe be-

schränkt sein muss, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in Epidermiszellen oder in den Knollen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen Δ -6-Desaturase-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert
5 erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression des Δ -6-Desaturase-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des Δ -6-Desaturase-Gens und deren Auswirkung auf die Fettsäure-, Öl- oder Lipidbiosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen
10 getestet werden.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- Verfahren zur Transformation einer Pflanz aus der Familie der Brassicaceae oder Linaceae dadurch gekennzeichnet, dass man erfindungsgemäße Expressionskassetten enthaltend eine Δ -6-Desaturase-Gensequenz aus Primulaceen
15 oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- Verwendung einer Δ -6-Desaturase-DNA-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Δ -6-Doppelbindungen durch Expression
20 dieser Δ -6-Desaturase DNA-Sequenz in Pflanzen.
- Proteine enthaltend die in SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenzen.
- Verwendung der Proteine mit den Sequenzen SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren.

25

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiele

Beispiel 1: Allgemeine Klonierungsverfahren:

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

10 Beispiel 2: Sequenzanalyse rekombinanter DNA:

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 und überprüft.

Beispiel 3: Klonierung von PUFA-spezifischen Desaturasen aus *Primula cortusoides* und *Primula lutoides*.

Während die Mehrheit der höheren Pflanzen (Angiospermae, Gymnospermae) keine Δ -6-desaturierten Fettsäuren, den Vorstufen für die Synthese von PUFA, synthetisieren, enthalten die Familien der Boraginaceae, Saxifragaceae und Primulaceae Spezies, die diese Fettsäure akkumulieren. Aus diesem Grund stellen Mitglieder dieser Spezies Quellen zur Identifizierung von Δ -6-Desaturasen dar.

Primula cortusoides und *Primula lutoides* (Eukaryota; Plantae, Tracheophyta, Angiospermae, Primulales, Primulaceae) wurden ausgewählt, da bei Spezies Δ -6-desaturierte Produkte und hier vor allem 18:4 Δ ^{6,9,12/15}, der Vorstufe von EPA im Samen akkumulieren. Zur Isolierung von DNA wurden Samen von Chiltern Seeds, Cumbria, England bezogen und unter folgenden Bedingungen angezogen:

Vor der Aussaat wurden die Samen für mindestens 3 Stunden in kaltem Wasser gequollen. Ausgesät wurden die Samen in einem Abstand von mindestens 1 cm auf Blumenerde mit 20 % Sand. Unter der Erde befindet sich eine Schicht aus Perlit (1/3 Vo-

lumen zur Erde). Die Samen wurden nach der Aussaat mit Perlit bedeckt, reichlich von oben bewässert und unter Langtagbedingungen (16h Licht, 100 µEm-2s-1 , 21 oC, 8 h Nacht, 17°C) gehalten.

5 GesamtRNA wurde wie in Sayanova et al. 1997, Proc. Natl. Acad. Sei. USA 94, 421 1-4216 beschrieben, extrahiert. Erst-Strang cDNA wurde ausgehend von GesamtRNA synthetisiert mittels des SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) entsprechend der Herstellerangaben.

10 Um neue Desaturase-Gene zu identifizieren wurden folgende degenerierte Primer für die Amplifikation eingesetzt:

Deg1:

5'- GGITCA(C/T)GA(T/C) (T/G/A)(C/G)IGGICA(C/T)TA-3'

15

Deg2:

5'- CC(A/G)TCIGT(A/G)T(T/G)IA(G/A)IGC(T/C)TCCCA-3'

Folgende Bedingungen wurden für die Amplifikation verwendet:

20

95°C 2 min, gefolgt von 30 Zyklen mit 94°C für 30 s, 30 s mit 55-72°C, 72°C für 2 min. Abschließend wurde mit 10 min bei 72°C verlängert. PCR Amplikons wurden entsprechend der Herstellerangaben in pGEM-T (Promega) kloniert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzangaben wurden zur Herstellung von Voll-Längenklonen eingesetzt.

25 Dazu wurden am 5' und 3' Ende gen-spezifische Primer synthetisiert und ausgehend von der cDNA amplifiziert.

Es wurde je eine Sequenz identifiziert, die Ähnlichkeit zu Desaturase-Genen zeigt.

Gen	Spezies	Nukleotide	SEQ ID NO:
Cort6	<i>P. cortusoides</i>	1353 bp	3
Lut6	<i>P. lutoides</i>	1350 bp	1

30

Beispiel 4: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression von *P. cortusoide* und *P. lutoides* Genen in Hefen

Zur heterologen Expression in Hefen wurden über PCR mit entsprechenden spezifischen Primern die entsprechenden Sequenzen amplifiziert und in den Hefe-

- 5 Expressionsvektor pYES2 (Invitrogen) über *Kpn*I-*Sac*I kloniert. Dabei wurden ausschließlich die für die PUFA-Proteine kodierende offenen Leserrahmen der Gene amplifiziert. Zusätzlich wurden am 5' Ende eine Restriktionssequenz für *Kpn*I sowie eine Kozak-Sequenz (Cell 1986, 44:283-292) und am 3' Ende eine Restriktionssequenz für *Sac*I angehängt:

10

Gen	Basenpaare	Primer	SEQ ID NO :
Cort6	1353	Fwd : GGTACCATGGCCAACCCATCAAAAAC	5
		Rvs : 3' CCTTCCACACACACGGATAAGAGCTCC	6
Lut6	1350	Fwd : GGTACCATGGCTAACAATCTCAAAC	7
		Rvs : 3' CTGTTCAAACCTCGGGTGAGGAGCT	8

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 μ L):

- 5,00 μ L Template cDNA
- 15 5,00 μ L 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl₂
- 5,00 μ L 2mM dNTP
- 1,25 μ L je Primer (10 pmol/ μ L des 5'-ATG sowie des 3'-Stopp Primers)
- 0,50 μ L Advantage-Polymerase
- Die Advantage-Polymerase von Clontech wird eingesetzt.

- 20 Reaktionsbedingungen der PCR:

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

- 25 Die PCR Produkte, sowie der pYES2 Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen *Kpn*I und *Sac*I 1h bei 37°C inkubiert und die Ligationsreaktion mittels Rapid Ligation Kit(Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Inkubationsreaktionen wurden dann in *E. coli* DH5 α -Zellen (Invitrogen) nach Herstellerangaben transformiert. Positive

Klone wurden durch PCR (siehe Reaktion oben) identifiziert und die Plasmid-DNA isoliert (Qiagen Dneasy). Die entstandene Plasmide pYCort β und pYLut β wurden durch Sequenzierung überprüft und in den *Saccharomyces* Stamm W303-1A mittels der Lithiumacetat-Methode transformiert. Zur Kontrolle wurde pYES2 (Leervektor) parallel transformiert. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Komplet-

5 Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil.

Für die Expression der Gene aus *P. cortusoides* und *P. lutoides* wurden zunächst Vorkulturen aus jeweils 5 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose aber ohne Uracil mit je einem ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei 30°C, 200

10 rpm inkubiert.

5 ml CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil) mit 2% Raffinose und 300 μ M der verschiedenen Fettsäuren wurden dann mit den Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Expression wurde durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen werden für weitere 96 h bei 22°C inkubiert.

15 Beispiel 5: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Expression in Pflanzen

Für die Transformation von Pflanzen wurden weitere Transformationsvektoren auf Basis von pBIN19-35S (Bevan M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucl. Acids Res. 18:203) erzeugt. Dazu wurden mit folgenden Primerpaaren BamHI-Xöal-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenz eingefügt:

20

Gen	Basenpaare	Primer	SEQ ID NO
Cort6	1353 bp	Fwd : GGATCCACCATGGCCAACCCATCAAAAAC	9
		Rvs : 3' CCTTCCACACACACGGATAAGGTCTAGA	10
Lut6	1350 bp	Fwd : GGATCCACCATGGCTAACAAATCTCAAAC	11
		Rvs : 3' CTGTTCAAACCTCTCGGGTGAGGTCTAGA	12

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 μ L):

5,00 μ L Template cDNA

5,00 μ L 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl₂

25 5,00 μ L 2mM dNTP

1,25 μ Lje Primer (10 pmol/ μ L)

0,50 μ L Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wird eingesetzt.

Die PCR Produkte, sowie der pBin19-35S Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xba*I 1h bei 37°C inkubiert und die Ligationsreaktion mittels Rapid Ligation Kit(Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Inkubationsreaktionen wurden dann in *E. coli* DH5 α -Zellen (Invitrogen) nach Herstellerangaben transformiert. Positive Klone wurden durch PCR (siehe Reaktion oben) identifiziert und die Plasmid-DNA isoliert (Qiagen Dneasy). Die entstandene Plasmide pBIN-Cort6 und pBIN-Lut θ wurden dann in *Agrobacterium tumefaciens* GC3101 durch Elektroporation transformiert und auf Agar-Platten mit 2% YEB Medium+Kanamycin plattiert. Kanamycin-tolerante Zellen wurden ausgewählt und für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* eingesetzt.

10 Beispiel 6: Expression von *P. cortusoides* und *P. lutoides* Genen in Hefen

Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit dem Plasmid pYES2 oder den Plasmiden pYES-Cort δ und pYES-Lut θ transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium

- 15 und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO₃, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 μ l PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 μ m, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert. Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360): 1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

30 Beispiel 7: Funktionelle Charakterisierung

Die Aktivität und Substratspezifität der einzelnen Gene wurde durch Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt. Die Substratspezifität von Desaturasen kann nach Expression in Hefe durch die Fütterung mittels verschiedener Fettsäuren

35

ermittelt werden. Beschreibungen für die Bestimmung der einzelnen Aktivitäten finden sich in WO 93/1 1245, WO 94/1 1516, WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393, WO 96/21022, WO0021557 und WO 99/271 11, Qiu et al. 2001, J. Biol. Chem. 276, 31561-31566 für Δ^4 -Desaturasen, Hong et al. 2002, Lipids 37,863-868 für Δ^5 -

5 Desaturasen.

a) Charakterisierung von Cort6:

Das Konstrukt pYES-Cort δ wurde durch Fütterung mit verschiedenen Fettsäuren in Hefe getestet. Überraschenderweise konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass nach Fütterung mit den Fettsäuren 18:2 $\Delta^{9,12}$ und 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ neue Fettsäuren

10 entstanden sind (Figur 1).

Figur 1: Gaschromatographische Analyse von Hefen, die das Plasmid pYCort 6 enthalten und mit 18:2 gefüttert wurden. Die neu gebildete Fettsäure ist γ 18:3 $\Delta^{6,9,12}$ (γ -Linolensäure = GLA).

15 Auf Grund der neu entstandenen Fettsäure konnte für Cort6 eine Δ -6-Desaturaseaktivität nachgewiesen werden. Das Enzym konnte dabei 18:2 und 18:3 als Substrat verwenden.

b) Charakterisierung von Lut6:

Überraschenderweise konnte nach Fütterung von 18:3 gezeigt werden, dass Lut6 eine Δ -6-Desaturase-Aktivität besitzt (Figur 2).

20 Figur 2: Fettsäuremuster von Hefen mit dem Konstrukt pYLut6 transformiert wurden und mit der Fettsäure 18:3 $\Delta^{9,12,15}$ gefüttert wurde. Die entsprechenden Fettsäuren sind markiert. SDA (Stearidonsäure) entspricht 18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$.

Die Aktivität von Lut6 entspricht damit der Aktivität einer Δ -6-Desaturase.

25 Beispiel 8: Erzeugung von transgenen Pflanzen

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

Zur Erzeugung transgener Rapspflanzen werden binäre Vektoren wie die unter Beispiel 5 erzeugten pBIN-35S Plasmide in *Agrobacterium tumefaciens* GC3101 transfor-

miert (Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788). Zur Transformation von Rapspflanzen (Var. Drakkar, NPZ Nordeutsche Pflanzenzucht, Hohenlieth, Deutschland), wird eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) mit 3 % Saccharose (3MS-Medium) benutzt. Petiolen oder Hypokotyledonen frisch gekeimter steriler Rapspflanzen (zu je ca. 1 cm²) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgt eine 3-tägige Co-Inkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 3MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 3 Tagen mit 16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 20 µM Benzylaminopurin (BAP) und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Bildeten sich nach drei Wochen keine Wurzeln, so wurde als Wachstumshormon 2-Indolbuttersäure zum Bewurzeln zum Medium gegeben.

Regenerierte Sprosse wurden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer oder im Gewächshaus angezogen, zur Blüte gebracht, reife Samen geerntet und auf Expression der Desaturase- bzw. Elongase-Gene mittels Lipidanalysen untersucht wie beispielhaft in Qiu et al. 2001, J. Biol. Chem. 276, 31561-31566 beschrieben.

b) Herstellung von transgenen Leinpflanzen

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

Beispiel 9: Lipidextraktion aus Blättern:

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des

- gewünschten Produktes (d.h. von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-
- 5 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) "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.
- 10 (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, FJ. (1989) Separation and purification techniques
- 15 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): 12935-1 2940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W.,

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

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

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden:

30 GC₁GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

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

Pflanzenmaterial wird zunächst mechanisch durch Mörsern homogenisiert, um es einer Extraktion zugänglicher zu machen. Dann wird 10 min auf 100°C erhitzt und nach dem Abkühlen auf Eis erneut sedimentiert. Das Zellsediment wird mit 1 M methanolischer Schwefelsäure und 2 % Dimethoxypropan 1h bei 90°C hydrolysiert und die Lipide transmethyliert. Die resultierenden Fettsäuremethylester (FAME) werden in Petrolether extrahiert. Die extrahierten FAME werden durch Gasflüssigkeitschromatographie mit einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) und einem Temperaturgradienten von 170°C auf 240°C in 20 min und 5 min bei 240°C analysiert. Die Identität der Fettsäuremethylester wird durch Vergleich mit entsprechenden FAME-Standards (Sigma) bestätigt. Die Identität und die Position der Doppelbindung kann durch geeignete chemische Derivatisierung der FAME-Gemische z.B. zu 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998) mittels GC-MS weiter analysiert werden.

Analyse von transgenen Arabidopsis Pflanzen, die Cort6 exprimieren:

Pflanze, die wie in Beispiel 5 mit den Plasmiden pBIN-Cort β und pBIN-Lut θ transformiert wurden, wurden auf veränderte Fettsäuren untersucht. Als Ausgangsmaterial wurden Blätter eingesetzt, die entsprechend obiger Beschreibung extrahiert und gaschromatographisch analysiert wurden.

Für beide Plasmide konnte dabei die Entstehung neuer Fettsäuren gezeigt werden (Figuren 3 und 4). Dabei konnte gezeigt werden, dass das Enzym Cort6 vorzugsweise

die endogen vorhandenen Fettsäure $18:2^{\Delta 9,12}$ umsetzt, während Lut6 überraschenderweise $18:3^{\Delta 9,12,15}$ zu SDA ($18:4^{\Delta 6,9,12,15}$) bevorzugt umsetzt. Daraus kann geschlossen werden, dass die beiden Enzyme im pflanzlichen Hintergrund bevorzugt zur Herstellung von GLA bzw. SDA, Vorstufen der PUFA ARA bzw. EPA, eingesetzt werden können.

5

Figur 3: Gaschromatographische Analyse der Fettsäuren aus Blattmaterial von Arabidopsis Pflanzen, die mit dem Plasmid pBIN-Cort6 transformiert wurden.

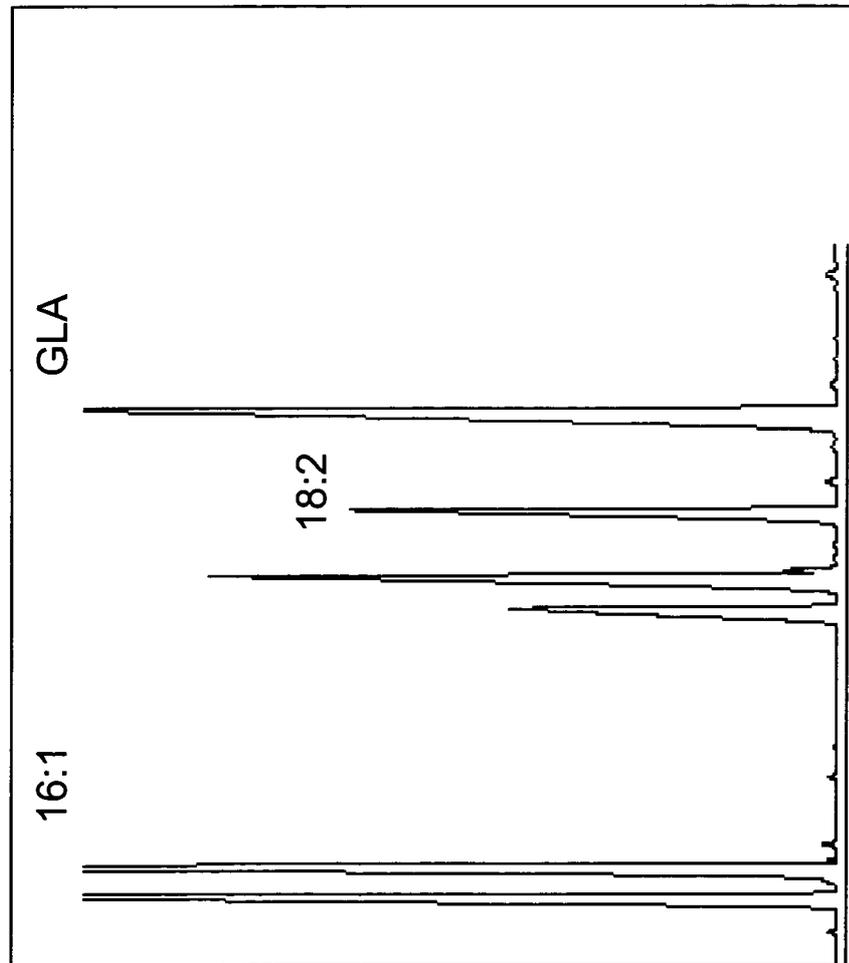
Patentansprüche

- 5
1. Verfahren zur Herstellung von γ -Linolensäure (18:3 $\Delta^{6,9,12}$) oder Stearidonsäure (18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$) oder γ -Linolensäure (18:3 $\Delta^{6,9,12}$) und Stearidonsäure (18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$) in transgenen Pflanzen der Familie Brassicaceae oder Linaceae, dadurch gekennzeichnet, dass die transgenen Pflanzen mindestens 10 Gew-% Ölsäure bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt enthalten und das folgende Verfahrensschritte umfassend:
- 10
- a) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz in die Ölpflanze, die für eine Δ -6-Desaturase aus einer Primula-Art codiert und als Substrat α -Linolensäure gegenüber Linolsäure bevorzugt, und
- b) Expression der durch die Nukleinsäure codierten Δ -6-Desaturase in der transgenen Pflanze, und
- c) Anzucht und Ernte der Pflanzen.
- 15
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenz, die für eine Δ -6-Desaturase aus einer Primula-Art codiert, ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz,
- 20
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide codieren, die auf Aminosäureebene mindestens 40 % Homologie mit SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 aufweisen und eine Δ -6-Desaturaseaktivität haben.
- 25
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass für die Expression der Nukleinsäuresequenzen gemäß Anspruch 1 (a), (b) und (c) diese funktionell mit einem Promotor oder Terminator oder Promotor und Terminator verbunden sind.
- 30
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Δ -6-Desaturaseaktivität zu einem erhöhten Gehalt an Δ -6-C₁₈-Fettsäuren in den Pflanzen führt.

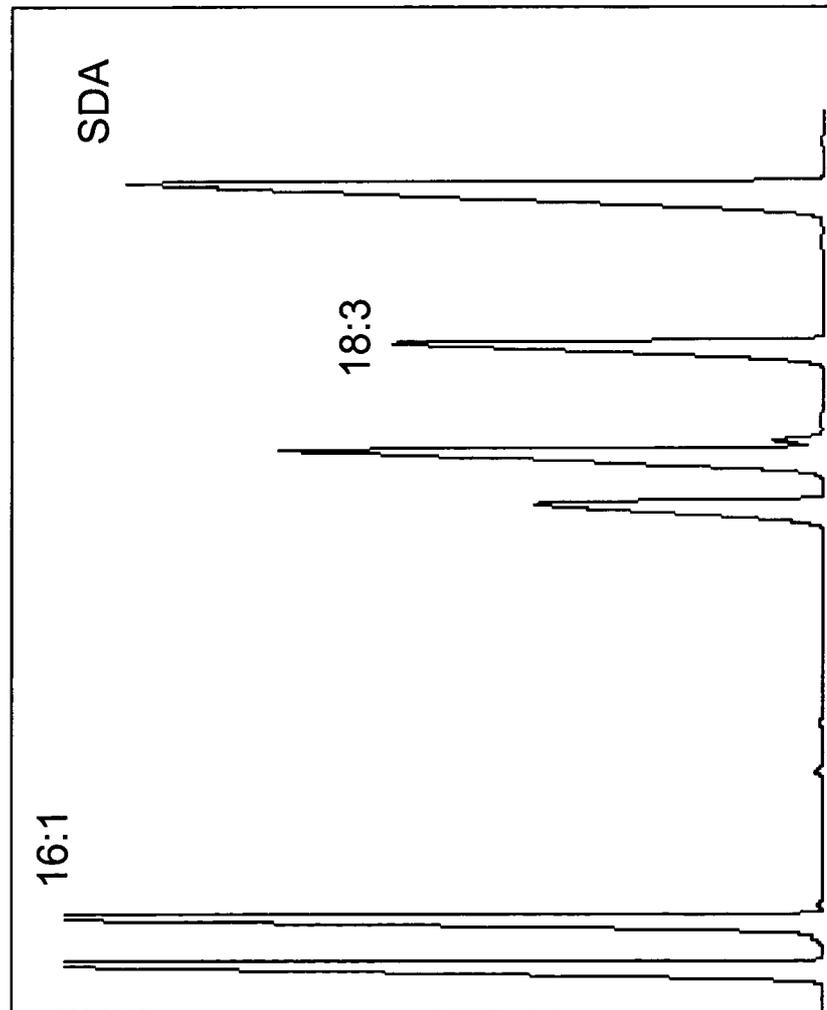
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass Δ -6-Desaturase eine Substratspezifität gegenüber α -Linolensäure besitzt, die um mehr als 20fach höher ist als die Substratspezifität gegenüber Linolsäure.
- 5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die als Δ -6-Desaturase als Substrat nur α -Linolensäure akzeptiert und Linolsäure nicht umgesetzt wird.
- 10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass ungesättigten Fettsäuren γ -Linolensäure (18:3 $\Delta^{6,9,12}$) oder (18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$) oder γ -Linolensäure (18:3 $\Delta^{6,9,12}$) und (18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$) im Samen der Ölpflanze erhöht werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass aus den geernteten Pflanzen die Samen isoliert werden.
- 15 9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die ungesättigten Fettsäuren γ -Linolensäure (18:3 $\Delta^{6,9,12}$) oder (18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$) oder γ -Linolensäure (18:3 $\Delta^{6,9,12}$) und (18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$) in Form eines Öls, Lipids oder in Form der freien Fettsäuren aus den transgenen Pflanzen der Familie Brassicaceae oder deren Samen isoliert werden.
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die im Öl oder in den Lipiden enthaltenen ungesättigten Fettsäuren in Form der freien Fettsäuren isoliert werden.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Öle, Lipide oder freien Fettsäuren mit andern tierischen, mikrobiellen oder pflanzlichen Ölen, Lipiden oder Fettsäuren zu Fettsäurezusammensetzungen gemischt werden.
- 25 12. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Öle, Lipide oder freien Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika zugesetzt werden.
- 30 13. Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ -6-Desaturaseaktivität codieren und wobei die codierte Δ -6-Desaturase als Substrat α -Linolensäure gegenüber Linolsäure bevorzugt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz,
 - b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 35

- 5 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide codieren, die auf Aminosäureebene mindestens 95 % Homologie mit SEQ ID NO: 2 aufweisen oder Derivate der in SEQ ID NO: 3 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide codieren, die auf Aminosäureebene mindestens 80 % Homologie mit SEQ ID NO: 4 aufweisen und die eine Δ -6-Desaturaseaktivität haben.
14. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 13, wobei die Sequenz von einer Pflanze stammt.
- 10 15. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 13 oder 14, wobei die Sequenz aus der Familie der Primulaceae stammt.
16. Proteine, die von einer isolierten Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 13 bis 15 codiert wird.
- 15 17. Genkonstrukt, enthaltend eine isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 13 bis 15, wobei die Nukleinsäure funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist.
- 20 18. Genkonstrukt nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt zusätzliche Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthält ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n).
- 25 19. Genkonstrukt nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt zusätzliche Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthält ausgewählt aus der Gruppe der Δ -4-Desaturasen, Δ -5-Desaturasen, Δ -8-Desaturasen, Δ -9-Desaturasen, Δ -12-Desaturasen, Δ -5-Elongasen, Δ -6-Elongasen oder Δ -9-Elongasen.
- 30 20. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach den Ansprüchen 13 bis 15 oder ein Genkonstrukt nach Anspruch 17 bis 19.
21. Transgene Brassicaceae oder Linaceae, enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 13 bis 15, ein Genkonstrukt nach Anspruch 17 bis 19 oder einen Vektor nach Anspruch 20.

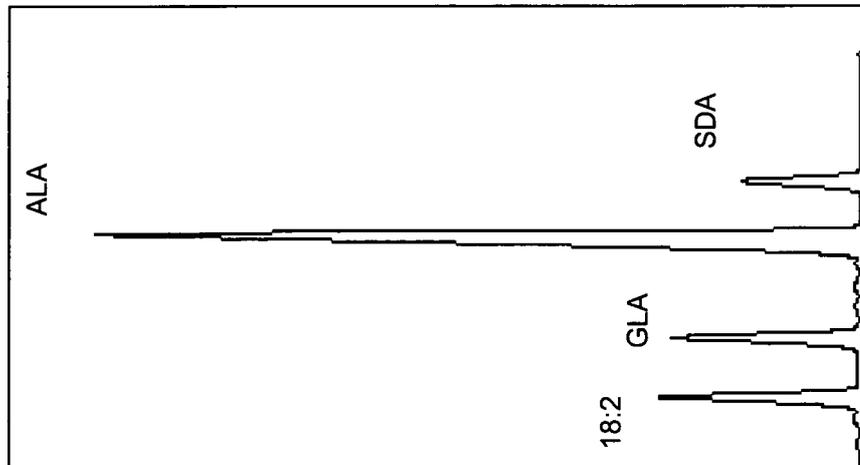
Figur 1: Gaschromatographische Analyse von Hefen, die das Plasmid pYCort6 enthalten und mit 18:2 gefüttert wurden. Die neu gebildete Fettsäure ist γ 18:3 ^{Δ 6,9,12} (γ -Linolensäure = GLA).



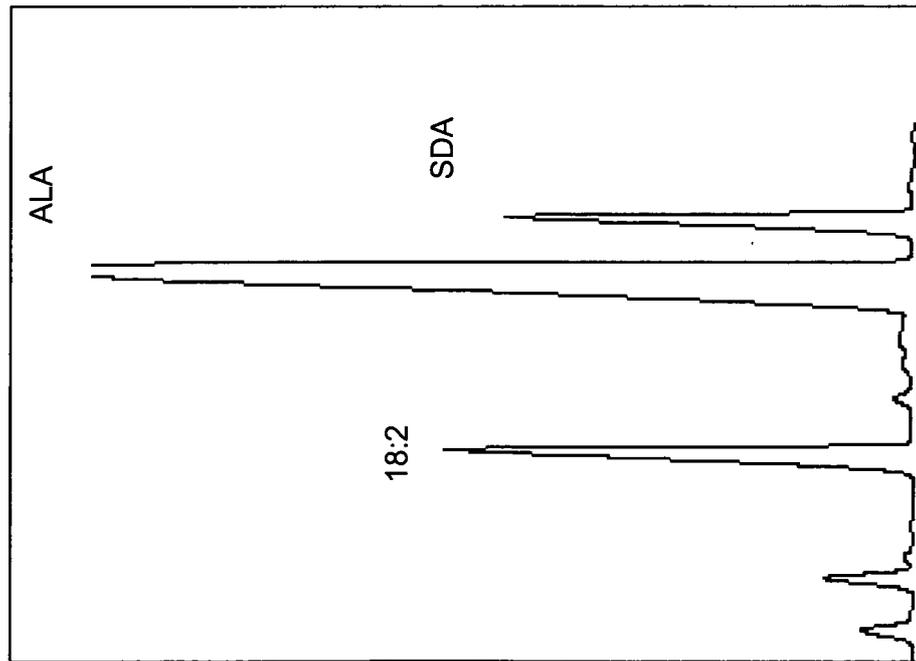
Figur 2: Fettsäuremuster von Hefen mit dem Konstrukt pYLut6 transformiert wurden und mit der Fettsäure 18:3^{Δ9,12,15} gefüttert wurde. Die entsprechenden Fettsäuren sind markiert. SDA (Stearidonsäure) entspricht 18:4^{Δ6,9,12,15}.



Figur 3: Gaschromatographische Analyse der Fettsäuren aus Blattmaterial von Arabidopsis Pflanzen, die mit dem Plasmid pBIN-Cort6 transformiert wurden.



Figur 4: Gaschromatographische Analyse der Fettsäuren aus Blattmaterial von Arabidopsis Pflanzen, die mit dem Plasmid pBIN-Lut6 transformiert wurden.



PF57260.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Rothamsted Research Ltd.

<120> Verfahren zur Herstellung von gamma-Linolensäure und/oder Stearidonsäure
in transgenen Brassicaceae und Linaceae

<130> 2005/1063

<140> PF 57260

<141>

<160> 12

<170> Patentin Version 3.1

<210> 1

<211> 1350

<212> DNA

<213> Primula lutoides

<220>

<221> CDS

<222> (I) ..C1350)

<223> Delta-6-Desaturase

<400> 1

atg gct aac aaa tct caa aca ggt tac ata acg agc tca gaa ctg gaa	48
Met Ala Asn Lys Ser Gin Thr GIy Tyr Ile Thr Ser Ser Glu Leu Glu	
1 5 10 15	
acc cac aac aag gca gga gac cta tgg ata tca ata cac ggg cag gtc	96
Thr His Asn Lys Ala GIy Asp Leu Trp ile Ser ile His GIy Gin val	
20 25 30	
tac gac gtq tcc tcg tgg gcc ggc ctt cat ccg ggg ggc acc gcc ccc	144
Tyr Asp Val Ser Ser Trp Ala GIy Leu His Pro GIy Gly Thr Ala Pro	
35 40 45	
ctt ttg gcc ctc gca gga cac gac gtq acc gat gct ttc ctc gcc tac	192
Leu Leu Ala Leu Ala GIy His Asp val Thr Asp Ala Phe Leu Ala Tyr	
50 55 60	
cat ccc cct tcc acc gcc cgc ctc ctc cct ccc ctt tcc acc cac ctc	240

PF57260.txt

His 65	Pro	Pro	ser	Thr	Ala 70	Arg	Leu	Leu	Pro	Pro 75	Leu	Ser	Thr	His	Leu 80	
ctc	ctt	caa	cac	cac	tcc	gtc	tcc	ccc	acc	tcc	tcc	gac	tac	cgc	tcc	288
Leu	Leu	Gin	His	His 85	Ser	val	Ser	Pro	Thr 90	ser	Ser	Asp	Tyr	Arg 95	ser	
ctc	ctt	gac	aac	ttc	cat	aaa	ctt	gqc	ctt	ttc	cgc	gcc	agg	gqc	cac	336
Leu	Leu	Asp	Asn 100	Phe	His	Lys	Leu	GIY 105	Leu	Phe	Arg	Ala	Arg 110	GIY	His	
act	gct	tac	gcc	acg	ttc	gtc	atc	atg	ata	gcg	atg	ttt	cta	gcg	agt	384
Thr	Ala	Tyr 115	Ala	Thr	Phe	Val	Ile 120	Met	Ile	Ala	Met	Phe 125	Leu	Ala	Ser	
gtg	acc	gga	gtc	ctc	tgc	agc	gac	aaa	gca	tgg	gtc	cat	ctg	gct	agc	432
val	Thr	GIY 130	val	Leu	cys	ser	Asp 135	Lys	Ala	Trp	val 140	His	Leu	Ala	ser	
ggt	ggg	gca	atg	ggg	ttc	gcc	tgg	atc	cag	tgc	gga	tgg	ata	ggt	cac	480
GIY	GIY	Ala	Met	GIY 150	Phe	Ala	Trp	Ile	Gin	Cys 155	GIY	Trp	ile	GIY	His 160	
gac	tct	ggg	cat	tac	egg	att	atg	tcc	ggt	gaa	aaa	tgg	aac	egg	ttc	528
Asp	Ser	GIY	His 165	Tyr	Arg	ile	Met	Ser	GIY 170	Glu	Lys	Trp	Asn 175	Arg	Phe	
gcg	caa	att	ctg	agc	aca	aac	tgc	ctc	cag	ggg	atc	agt	atc	ggg	tgg	576
Ala	Gin	ile 180	Leu	Ser	Thr	Asn	Cys	Leu 185	Gin	Gly	ile	Ser 190	ile	GIY	Trp	
tgg	aag	tgg	aac	cac	aac	gct	cac	cac	atc	gct	tgc	aat	agc	ctg	gac	624
Trp	Lys	Trp 195	Asn	His	Asn	Ala	His 200	His	Ile	Ala	Cys	Asn 205	Ser	Leu	Asp	
tac	gac	ccc	gac	ctc	cag	tat	atc	cet	ttg	ctc	gtc	gtc	tcc	ccc	aag	672
Tyr	Asp	Pro 210	Asp	Leu	Gin	Tyr 215	ile	Pro	Leu	Leu	Val 220	val	Ser	Pro	Lys	
ttt	ttc	aac	tcc	ctt	act	tct	cgt	ttc	tat	gac	aag	aag	ctg	aac	ttc	720
Phe	Phe	Asn	Ser	Leu	Thr 230	Ser	Arg	Phe	Tyr	Asp 235	Lys	Lys	Leu	Asn 240	Phe	
gac	ggt	gtg	tct	agg	ttc	ttg	gtt	tgc	tac	cag	cac	tgg	acg	ttt	tat	768
Asp	Gly	Val	Ser 245	Arg	Phe	Leu	val	Cys	Tyr 250	Gin	His	Trp	Thr	Phe 255	Tyr	
ccg	gtc	atg	tgt	gtc	gct	agg	ctt	aac	atg	atc	gcg	cag	teg	ttt	ata	816
Pro	Val	Met	Cys 260	val	Ala	Arg	Leu	Asn 265	Met	Ile	Ala	Gin	Ser 270	Phe	ile	
atg	ctc	ttc	teg	agt	agg	gag	gtg	gcg	caa	agg	gtg	caa	ggg	att	ttc	864
Met	Leu	Phe 275	ser	ser	Arg	Glu	val	Ala	Gin	Arg	val	Gin 285	GIY	ile	Phe	
gga	ctt	gcc	gtg	ttt	tgg	gtt	tgg	ttt	ccg	ctt	tta	ctt	tct	tgc	tta	912
GIY	Leu	Ala	val	Phe	Trp 295	val	Trp	Phe	Pro	Leu	Leu 300	Leu	Ser	Cys	Leu	
cet	aat	tgg	ggg	gag	agg	ata	atg	ttt	ttg	ctt	gcg	agc	tat	tcc	gtt	960
Pro	Asn	Trp	Gly	Glu 310	Arg	ile	Met	Phe	Leu	Leu 315	Ala	ser	Tyr	ser	val 320	
acg	ggg	ata	caa	cac	gtg	cag	ttc	agc	ttg	aac	cat	ttt	tct	teg	gac	1008
Thr	Gly	ile	Gin	His 325	Val	Gin	Phe	Ser	Leu	Asn 330	His	Phe	Ser	Ser 335	Asp	
gtc	tac	gtg	ggc	ccg	cca	gta	ggt	aac	gac	tgg	ttc	aag	aaa	cag	act	1056
val	Tyr	val	GIY	Pro	Pro	Val	Gly	Asn	Asp	Trp	Phe	Lys	Lys	Gin	Thr	

PF57260.txt

340	345	350	
gcg ggg acg ctt aac ata tcg tgc ccg gcg tgg atg gat tgg ttc cat			1104
Ala GIy Thr Leu Asn Ile Ser Cys Pro Ala Trp Met Asp Trp Phe His			
355	360	365	
ggc ggg ttg cag ttt cag gtc gag cac cac ttg ttc ccg egg atg ect			1152
GIy GIy Leu Gin Phe Gin Val Glu His His Leu Phe Pro Arg Met Pro			
370	375	380	
agg ggt caa ttt agg aag att tet cet ttt gtg agg gat ttg tgt aag			1200
Arg GIy Gin Phe Arg Lys Ile Ser Pro Phe Val Arg Asp Leu Cys Lys			
385	390	395	400
aaa cac aat ttg cet tac aat atc gca tet ttt act aaa gca aac gtt			1248
Lys His Asn Leu Pro Tyr Asn Ile Ala Ser Phe Thr Lys Ala Asn Val			
405	410	415	
ttg acg ctt atg acg ctg aga aat aca gec gtt gag get egg gac etc			1296
Leu Thr Leu Met Thr Leu Arg Asn Thr Ala Val Glu Ala Arg Asp Leu			
420	425	430	
tet aat ccg atc ccg aag aat atg gtg tgg gaa get gtt caa act etc			1344
ser Asn pro ile pro Lys Asn Met val Trp Glu Ala val Gin Thr Leu			
435	440	445	
ggg tga			1350
GIy			

<210> 2

<211> 449

<212> PRT

<213> *Primula lutoides*

<400> 2

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

PF57260.txt

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

PF57260.txt

Arg Gly Gin Phe Arg Lys ile ser Pro Phe val Arg Asp Leu Cys Lys
 385 390 395 400

Lys His Asn Leu Pro Tyr Asn Ile Ala Ser Phe Thr Lys Ala Asn Val
 405 410 415

Leu Thr Leu Met Thr Leu Arg Asn Thr Ala val Glu Ala Arg Asp Leu
 420 425 430

Ser Asn Pro Ile Pro Lys Asn Met Val Trp Glu Ala val Gin Thr Leu
 435 440 445

Gly

<210> 3

<211> 1353

<212> DNA

<213> Primula cortusoides

<220>

<221> CDS

<222> CD-. (1353)

<223> Delta-6-Desaturase

<400> 3

atg gcc aac cca tca aaa aac agt tac att tcc gtc tca gac ctc aaa 48
 Met Ala Asn Pro Ser Lys Asn Ser Tyr Ile Ser val Ser Asp Leu Lys
 1 5 10 15

acc cac aac aag ccc gga gac ctc tgg ata tcc atc cac ggc caa gtc 96
 Thr His Asn Lys Pro Gly Asp Leu Trp ile Ser Ile His Gly Gin Val
 20 25 30

tac gac gtc tct gcg tgg gcg cca cgc cac cct ggc ggc ctc cct ctc 144
 Tyr Asp val Ser Ala Trp Ala Pro Arg His Pro Gly GIy Leu Pro Leu
 35 40 45

ctc ctc tct cac ggc ggt cat gac gtc acg gat gcc ttc ctc gcc tac 192
 Leu Leu Ser His GIy GIy His Asp val Thr Asp Ala Phe Leu Ala Tyr
 50 55 60

cac ccc ccc tcg gtt tcc cgc ctc ctc cct tct ctc tct acc tac ctc 240
 His Pro Pro Ser Val Ser Arg Leu Leu Pro Ser Leu Ser Thr Tyr Leu
 65 70 75 80

cgc ctc gaa aac cac tcc gtc tcc gcc ccc tcc tcc gac tac cgc acc 288
 Arg Leu Glu Asn His Ser Val Ser Ala Pro Ser Ser Asp Tyr Arg Thr
 85 90 95

ctc ctt tcc cat ttc gac aac ctc ggc ctc ttc cac acc aag ggc cac 336
 Leu Leu ser His Phe Asp Asn Leu GIy Leu Phe His Thr Lys Gly His
 100 105 110

PF57260.txt

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

PF57260.txt

ccg agg agt caa ctt aga aag atc tct cct ttt gtt aag gat ttg tgt 1200
 Pro Arg ser Gin Leu Arg Lys ile ser pro Phe val Lys Asp Leu cys
 385 390 395 400

aaa aaa cat aac ttg cct tac aag atc gcg tct ttt aca acg gcc aat 1248
 Lys Lys His Asn Leu Pro Tyr Lys Ile Ala Ser Phe Thr Thr Ala Asn
 405 410 415

gtg ttg atg ctt agg act ctg aga aat gtt gct att aag gct egg gac 1296
 VaT Leu Met Leu Arg Thr Leu Arg Asn val Ala Ile Lys Ala Arg Asp
 420 425 430

ctt tct aat ccg atc ccg aag aat ttg gtg tgg gaa gcc ttc cac aca 1344
 Leu ser Asn pro ile Pro Lys Asn Leu val Trp Glu Ala Phe His Thr
 435 440 445

cac gga taa 1353
 His GIy
 450

<210> 4

<211> 450

<212> PRT

<213> Primula cortusoides

<400> 4

Met Ala Asn Pro Ser Lys Asn Ser Tyr Ile Ser Val Ser Asp Leu Lys
 1 5 10 15

Thr His Asn Lys Pro Gly Asp Leu Trp ile Ser Ile His Gly Gin val
 20 25 30

Tyr Asp val ser Ala Trp Ala Pro Arg His Pro Gly Gly Leu Pro Leu
 35 40 45

Leu Leu Ser His Gly Gly His Asp val Thr Asp Ala Phe Leu Ala Tyr
 50 55 60

His Pro Pro Ser val Ser Arg Leu Leu Pro Ser Leu Ser Thr Tyr Leu
 65 70 75 80

Arg Leu Glu Asn His Ser val Ser Ala Pro Ser ser Asp Tyr Arg Thr
 85 90 95

Leu Leu Ser His Phe Asp Asn Leu Gly Leu Phe His Thr Lys Gly His
 100 105 110

Thr Ile Leu Ala Thr Phe val Ile Met ile Ala Ser ile Leu Phe Cys
 115 120 125

Leu Cys Gly Ile Phe Leu Ser Thr Ser Phe Trp Val His Leu Ala Ser
 130 135 140

PF57260.txt

Gly val Leu ile Gly Phe Ala Trp Ile Gin Cys Gly Trp Leu Gly His
 145 150 155 160

Asp Ser Gly His Tyr Lys ile Thr Ser Gly Lys Lys Ser Asn Arg Phe
 165 170 175

Ala Gin val Leu val Gly Asn Cys Phe Ala Gly ile ser ile Glu Trp
 180 185 190

Trp Lys Trp Asn His Asn Ala His His Thr Ser Cys Asn Ser Leu Asp
 195 200 205

His Asp Pro Asp Leu Gin Tyr ile Pro Phe Leu val val Ser ser Lys
 210 215 220

Phe Phe Thr Ser Met Ile Thr Ser Arg Phe Tyr Asn Lys Lys Leu Asn
 225 230 235 240

Phe Asn Ala Met Ser Arg Phe Leu val Ser Tyr Gin His Trp Ser Phe
 245 250 255

Tyr Pro Val Met Cys Leu Ala Arg val Asn Met Phe Leu Gin Ser Leu
 260 265 270

val Phe Leu Phe Phe Asn Lys Glu Val Gin Asn Arg val Gin Glu ile
 275 280 285

Leu Gly Ile Ala val Phe Trp val Trp Phe Pro Leu val val Ser Ser
 290 295 300

Leu Pro Asn Trp Gly Glu Arg ile Met Phe Leu val Ala Ser Phe Ser
 305 310 315 320

ile Thr Gly ile Gin Gin val Gin Phe Ser val Asn His Phe ser Ser
 325 330 335

Asp Val Tyr Val Gly Pro Pro Met Glu Asn Asp Trp Phe Glu Lys Gin
 340 345 350

Thr Ala Gly Thr Leu Asn ile Ser Cys Pro Thr Trp Met Asp Trp Phe
 355 360 365

His Gly Gly Leu Gin Phe Gin ile Glu His His Leu Phe Pro Arg Met
 370 375 380

Pro Arg ser Gin Leu Arg Lys ile ser pro Phe val Lys Asp Leu cys
 385 390 395 400

Lys Lys His Asn Leu Pro Tyr Lys Ile Ala Ser Phe Thr Thr Ala Asn
 405 410 415

Val Leu Met Leu Arg Thr Leu Arg Asn Val Ala Ile Lys Ala Arg Asp

PF57260.txt

420

425

430

Leu Ser Asn Pro ile Pro Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Phe His Thr
 435 440 445

His Gly
 450

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> unknown

<220>

<223> artificial sequence

<220>

<221> **misc_feature**

<222> (D..C27)

<223>

<400> 5

ggtaccatgg ccaaccatc aaaaaac

27

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> **unknown**

<220>

<223> **artificial sequence**

<220>

<221> **misc_feature**

<222> **d)..(27)**

<223>

<400> 6

ccttcacac acacggataa gagctcc

27

<210> 7

PF57260.txt

<211> 26

<212> DNA

<213> unknown

<220>

<223> artificial sequence

<220>

<221> mi sc_feature

<222> (D..C26)

<223>

<400> 7

ggtaccatgg ctaacaaatc tcaaac

26

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> unknown

<220>

<223> artificial sequence

<220>

<221> mi sc_feature

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 8

ctggtcaaac tctcgggtga ggagct

26

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> unknown

<220>

<223> artificial sequence

<220>

PF57260.txt

<221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 9

ggatccacca tggccaaccc atcaaaaaac

30

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> unknown

<220>

<223> artificial sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 10

ccttcacac acacggataa ggtctaga

28

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> unknown

<220>

<223> artificial sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 11

ggatccacca tggctaacaa atctcaaac

29

PF57260.txt

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> unknown

<220>

<223> artificial sequence

<220>

<221> mi_sc_feature

<222> C1).. (28)

<223>

<400> 12
ctggttcaaac tctcgggtga ggtctaga

28