



(19) Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 10 2005 013 779 A1 2006.09.28

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2005 013 779.2

(22) Anmeldetag: 22.03.2005

(43) Offenlegungstag: 28.09.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12N 15/52 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

(71) Anmelder:

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

(72) Erfinder:

**Cirpus, Petra, Dr., 68163 Mannheim, DE; Bauer, Jörg, Dr., 67061 Ludwigshafen, DE**

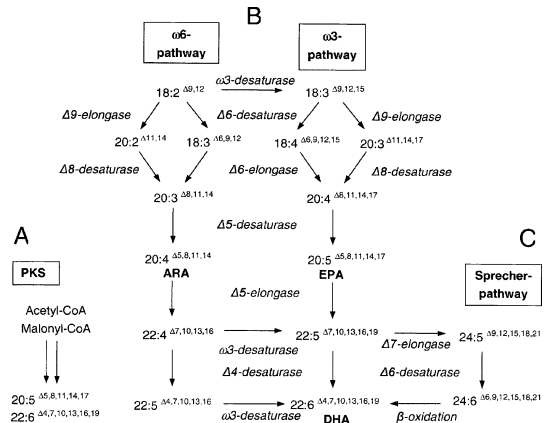
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten C20- und C22-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen in transgenen Pflanzen**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in transgenen Pflanzen, in dem Nucleinsäuren in die Pflanze eingebracht werden, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-, eine  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren. Vorteilhaft stammen diese Desaturasen und Elongasen aus *Phytostrophanthus sojae*.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Nucleinsäuresequenzen, Nucleinsäurekonstrukte, Vektoren und Organismen, enthaltend die erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen, Vektoren, enthaltend die Nucleinsäuresequenzen und/oder die Nucleinsäurekonstrukte, sowie transgene Pflanzen, enthaltend die vorgenannten Nucleinsäuresequenzen, Nucleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren.

Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Fettsäurezusammensetzungen, hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, und deren Verwendung.



**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in transgenen Pflanzen, in dem Nukleinsäuren die Pflanze eingebracht werden, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-, eine  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren. Vorteilhaft stammen diese Desaturasen und Elongasen aus *Phytophthora sojae*.

**[0002]** Die Erfindung betrifft weiterhin die Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und Organismen enthaltend die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen und/oder die Nukleinsäurekonstrukte sowie transgene Pflanzen enthalten die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren.

**[0003]** Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Fettsäurezusammensetzungen hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren und deren Verwendung.

**[0004]** Fettsäuren und Triacylglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem, ob es sich um freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren oder um Triacylglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet. Mehrfachungesättigte Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure sind für Säugetiere essentiell, da sie nicht von diesen selbst hergestellt werden können. Deshalb stellen mehrfach ungesättigte  $\omega$ -3-Fettsäuren und  $\omega$ -6-Fettsäuren einen wichtigen Bestandteil der tierischen und menschlichen Nahrung dar.

**[0005]** Mehrfach ungesättigte langkettige  $\omega$ -3-Fettsäuren wie Eicosapentaensäure (= EPA, C20:5 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14,17</sup>) oder Docosahexaensäure (= DHA, C22:6 <sup>$\Delta$ 4,7,10,13,16,19</sup>) 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 YK Pharmacol Res 40:211–225, 1999). Es besteht aus diesem Grund ein Bedarf an der Produktion mehrfach ungesättigter langkettiger Fettsäuren.

**[0006]** Aufgrund der heute üblichen Zusammensetzung der menschlichen Nahrung ist ein Zusatz von mehrfach ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren, die bevorzugt in Fischölen vorkommen, zur Nahrung besonders wichtig. So werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Docosahexaensäure (= DHA, C22:6 <sup>$\Delta$ 4,7,10,13,16,19</sup>) oder Eicosapentaensäure (= EPA, C20:5 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14,17</sup>) Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Der ungesättigten Fettsäure DHA wird dabei ein positiver Effekt auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Gehirnfunktionen zugeschrieben.

**[0007]** Im folgenden werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren als PUFA, PUFAs, LCPUFA oder LCPUFAs bezeichnet (poly unsaturated fatty acids, PUFA, mehrfach ungesättigte Fettsäuren; long chain poly unsaturated fatty acids, LCPUFA, langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

**[0008]** Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie *Mortierella* oder *Schizochytrium* oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Algen wie *Cryptocodium* oder *Phaeodactylum* und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form ihrer Triacylglyceride (= Triglyceride = Triglycerole) anfallen. Sie können aber auch aus Tieren wie z. B. Fischen gewonnen werden. Die freien Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung hergestellt. Sehr langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie DHA, EPA, Arachidonsäure (= ARA, C20:4 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14</sup>), Dihomo- $\gamma$ -linolensäure (C20:3 <sup>$\Delta$ 8,11,14</sup>) oder Docosapentaensäure (DPA, C22:5 <sup>$\Delta$ 7,10,13,16,19</sup>) werden in Ölfruchtpflanzen wie Raps, Soja, Sonnenblume, Färbarsaflor nicht synthetisiert. Übliche natürliche Quellen für diese Fettsäuren sind Fische wie Hering, Lachs, Sardine, Goldbarsch, Aal, Karpfen, Forelle, Heilbutt, Makrele, Zander oder Thunfisch oder Algen.

**[0009]** Je nach Anwendungszweck werden Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt. Sa werden z. B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fettsäuren speziell mehrfach ungesättigten Fettsäuren bevorzugt. Den mehrfach ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren wird dabei ein positiver Effekt auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Möglichkeit der Prävention einer Herzerkrankung zugeschrieben. Durch Zugabe dieser  $\omega$ -3-Fettsäuren zur Nahrung kann das Risiko einer Herzerkrankung, eines Schlaganfalls oder von Bluthochdruck deutlich verringert werden. Auch entzündliche speziell chronisch entzündliche Prozesse im Rahmen immunologischer Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis lassen sich durch  $\omega$ -3-Fettsäuren

positiv beeinflussen. Sie werden deshalb Lebensmitteln speziell diätischen Lebensmitteln zugegeben oder finden in Medikamenten Anwendung.  $\omega$ -6-Fettsäuren wie Arachidonsäure haben bei diesen rheumatischen Erkrankungen aufgrund unserer üblichen Nahrungsmittelzusammensetzung eher einen negativen Effekt auf diese Krankheiten.

**[0010]**  $\omega$ -3- und  $\omega$ -6-Fettsäuren sind Vorläufer von Gewebshormonen, den sogenannten Eicosanoiden wie den Prostaglandinen, die sich von der Dihomo- $\gamma$ -linolensäure, der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten, den Thromoxanen und Leukotrienen, die sich von der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten. Eicosanoide (sog. PG<sub>2</sub>-Serie), die aus  $\omega$ -6-Fettsäuren gebildet werden fördern in der Regel Entzündungsreaktionen, während Eicosanoide (sog. PG<sub>3</sub>-Serie) aus  $\omega$ -3-Fettsäuren geringe oder keine entzündungsfördernde Wirkung haben.

**[0011]** 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 Öfen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine  $\Delta$ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine  $\Delta$ -15-Desaturase in WO 94/11516 wird eine  $\Delta$ -12-Desaturase beansprucht. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144–20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200–203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649–659 beschrieben. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und zu charakterisieren sind (McKeon 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.  $\Delta$ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393, WO 96/21022, WO00/21557 und WO 99/27111 beschrieben und auch die Anwendung zur Produktion in transgenen Organismen beschrieben wie in WO98/46763 WO98/46764, WO9846765. Dabei wird auch die Expression verschiedener Desaturasen wie in WO99/64616 oder WO98/46776 und Bildung polyungesättigter Fettsäuren beschrieben und beansprucht. Bzgl. der Effektivität der Expression von Desaturasen und ihren Einfluss auf die Bildung polyungesättigter Fettsäuren ist anzumerken, dass durch Expression einer einzelnen Desaturase wie bisher beschrieben lediglich geringe Gehalte an ungesättigten Fettsäuren/Lipiden wie z. B.  $\gamma$ -Linolensäure und Stearidonsäure erreicht wurden. Weiterhin wurde in der Regel ein Gemisch aus  $\omega$ -3- und  $\omega$ -6-Fettsäuren erhalten.

**[0012]** Auch wurden in der Vergangenheit wurden zahlreiche Versuche unternommen, Elongase Gene zu erhalten. Millar and Kunst, 1997 (Plant Journal 12:121–131) und Millar et al. 1999, (Plant Cell 11:825–838) beschreiben die Charakterisierung von pflanzlichen Elongasen zur Synthese von einfachungesättigten langkettigen Fettsäuren (C<sub>22:1</sub>) bzw. zur Synthese von sehr langkettigen Fettsäuren für die Wachsbildung in Pflanzen (C<sub>28</sub>–C<sub>32</sub>). Beschreibungen zur Synthese von Arachidonsäure und EPA finden sich beispielsweise in WO0159128, WO0012720, WO02077213 und WO0208401. Die Synthese von mehrfachungesättigter C24 Fettsäuren ist beispielsweise in Tvrdik et al 2000, JCB 149:707–717 oder WO0244320 beschrieben.

**[0013]** Besonders geeignete Mikroorganismen zur Herstellung von PUFAs sind Mikroorganismen wie Mikroalgen wie Phaeodactylum tricornutum, Porphyridium-Arten, Thraustochytrien-Arten, Schizochytrien-Arten oder Cryptocodinium-Arten, Ciliaten, wie Stylonychia oder Colpidium, Pilze, wie Mortierella, Entomophthora oder Mucor und/oder Moosen wie Physcomitrella, Ceratodon und Marchantia (R. Vazhappilly & F. Chen (1998) Botanica Marina 41: 553–558; K. Totani & K. Oba (1987) Lipids 22: 1060–1062; M. Akimoto et al. (1998) Appl. Biochemistry and Biotechnology 73: 269–278). Durch Stammselektion ist eine Anzahl von Mutantenstämmen der entsprechenden Mikroorganismen entwickelt worden, die eine Reihe wünschenswerter Verbindungen, einschließlich PUFAs, produzieren. Die Mutation und Selektion von Stämmen mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls wie den mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist jedoch ein zeitraubendes und schwieriges Verfahren. Deshalb werden, wann immer möglich wie oben beschrieben gentechnologische Verfahren bevorzugt. Mit Hilfe der vorgenannten Mikroorganismen lassen sich jedoch nur begrenzte Mengen der gewünschten mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie DPA, EPA oder ARA herstellen. Wobei diese in der Regel je nach verwendeten Mikroorganismus als Fettsäuregemische aus beispielsweise EPA, DPA und ARA anfallen.

**[0014]** Für die Synthese von Arachidonsäure, Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) werden verschiedene Synthesewege diskutiert (Figur. 1). So erfolgt die Produktion von EPA bzw. DHA in marinen Bakterien wie Vibrio sp. oder Shewanella sp. nach dem Polyketid-Weg (Yu, R. et al. Lipids 35:1061–1064, 2000; Takeyama, H. et al. Microbiology 143:2725–2731, 1997).

**[0015]** Ein alternative Strategie verläuft über die wechselnde Aktivität von Desaturasen und Elongasen (Zank, T.K. et al. *Plant Journal* 31:255–268, 2002; Sakuradani, E. et al. *Gene* 238:445–453, 1999). Eine Modifikation des beschriebenen Weges über  $\Delta 6$ -Desaturase,  $\Delta 6$ -Elongase,  $\Delta 5$ -Desaturase,  $\Delta 5$ -Elongase,  $\Delta 4$ -Desaturase ist der Sprecher-Syntheseweg (Sprecher 2000, *Biochim. Biophys. Acta* 1486:219–231) in Säugetieren. Anstelle der  $\Delta 4$ -Desaturierung erfolgt hier ein weiterer Elongationsschritt auf  $C_{24}$ , eine weitere  $\Delta 6$ -Desaturierung und abschliessend eine  $\beta$ -Oxidation auf die  $C_{22}$ -Kettenlänge. Für die Herstellung in Pflanzen und Mikroorganismen ist der sogenannte Sprecher-Syntheseweg (siehe [Fig. 1](#)) allerdings nicht geeignet, da die Regulationsmechanismen nicht bekannt sind.

**[0016]** Für die Herstellung längererkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren wie Arachidonsäure, EPA oder besonders DHA ( $C_{22:6}$  n-3) sind, wie [Fig. 1](#) zu entnehmen ist, neben den Desaturasen auch Elongasen erforderlich, die ungesättigte Fettsäuren mit Doppelbindungen beispielsweise in delta-9-, delta-6- oder delta-5-Position um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängern. Ihrer Funktion nach werden dabei zwei verschiedene Elongasetypen unterschieden. Die Typ I-Elongasen, die im Tierreich weit verbreitet sind, haben nur eine geringe Substratspezifität, das heißt sie verlängern eine Reihe verschiedener ungesättigter Fettsäuren. Typ II-Elongasen zeichnen sich durch eine weit höhere Substratspezifität aus. Durch sie werden nur wenige Fettsäuren mit Doppelbindungen in spezifischen Positionen umgesetzt.

**[0017]** In WO 2005/012316 werden einige der vorgenannten Desaturasen und Elongasen beschrieben. Speziell werden in WO 2005/012316 erste Typ II-Elongasen offenbart, die spezifisch Fettsäuren mit einer Doppelbindung in delta-5-Position elongieren.

**[0018]** Die polyungesättigten Fettsäuren können entsprechend ihrem Desaturierungsmuster in zwei große Klassen, in  $\omega$ -6- oder  $\omega$ -3-Fettsäuren eingeteilt werden, die metabolisch und funktionell unterschiedlich Aktivitäten haben ([Fig. 1](#)).

**[0019]** Als Ausgangsprodukt für den  $\omega$ -6-Stoffwechselweg fungiert die Fettsäure Linolsäure ( $18:2^{\Delta 9,12}$ ), während der  $\omega$ -3-Weg über Linolensäure ( $18:3^{\Delta 9,12,15}$ ) abläuft. Linolensäure wird dabei durch Aktivität einer  $\omega$ -3-Desaturase gebildet (Tocher et al. 1998, *Prog. Lipid Res.* 37, 73–117 ; Domergue et al. 2002, *Eur. J. Biochem.* 269, 4105–4113).

**[0020]** Säugetiere und damit auch der Mensch verfügen über keine entsprechende Desaturaseaktivität ( $\Delta$ -12- und  $\omega$ -3-Desaturase) und müssen diese Fettsäuren (essentielle Fettsäuren) über die Nahrung aufnehmen. Über die Abfolge von Desaturase- und Elongase-Reaktionen werden dann aus diesen Vorstufen die physiologisch wichtigen polyungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure (= ARA,  $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ ), eine  $\omega$ -6-Fettsäure und die beiden  $\omega$ -3-Fettsäuren Eicosapentaen- (= EPA,  $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$ ) und Docosahexaensäure (DHA,  $22:6^{\Delta 4,7,10,13,17,19}$ ) synthetisiert. Die Applikation von  $\omega$ -3-Fettsäuren zeigt dabei die wie oben beschrieben therapeutische Wirkung bei der Behandlung von Herz-Kreislaufkrankheiten (Shimikawa 2001, *World Rev. Nutr. Diet.* 88, 100–108), Entzündungen (Calder 2002, *Proc. Nutr. Soc.* 61, 345–358) und Arthritis (Cleland und James 2000, *J. Rheumatol.* 27, 2305–2307).

**[0021]** Höhere Pflanzen enthalten mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure ( $C_{18:2}$ ) und Linolensäure ( $C_{18:3}$ ). ARA, EPA und DHA kommen im Samenöl höherer Pflanzen gar nicht oder nur in Spuren vor (E. Ucciani: *Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales. Technique & Documentation* – Lavoisier, 1995. ISBN: 2-7430-0009-0). Es wäre jedoch vorteilhaft, in höheren Pflanzen, bevorzugt in Ölsaaten wie Raps, Lein, Sonnenblume und Soja, LCPUFAs herzustellen, da auf diese Weise große Mengen qualitativ hochwertiger LCPUFAs für die Lebensmittelindustrie, die Tierernährung und für pharmazeutische Zwecke kostengünstig gewonnen werden können. Hierzu müssen vorteilhaft über gentechnische Methoden die Gene kodierend für Enzyme der Biosynthese von LCPUFAs in Ölsaaten eingeführt und exprimiert werden. WO 2005/012316 ist ein derartiger Ansatz zu entnehmen. Von Nachteil bei dem in WO 2005/012316 beschriebenen Weg ist jedoch noch, dass die Ausbeute an den gewünschten Fettsäuren für eine technische Nutzung noch zu gering ist. Außerdem entstehen neben den gewünschten Fettsäuren wie ARA, EPA oder DHA noch durch unerwünschte Nebenreaktionen Fettsäuren, die die Ausbeute weiter verringern und das entstehende Produkt verunreinigen.

**[0022]** Ein vorteilhaftes Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren sollte deshalb möglichst viele der folgenden Eigenschaften auf sich vereinigen:

- hohe Spezifität der für die Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren verwendeten Desaturasen und Elongasen,
- hohe Syntheseleistung der verwendeten Desaturasen und Elongasen,
- Synthese möglichst nur einer mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie ARA, EPA oder DHA,

- hohe Ausbeute an mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie ARA, EPA oder DHA oder deren Mischungen
- möglichst keine oder nur sehr geringe Mengen an unerwünschten Nebenprodukten,
- keine Herstellung unnatürlicher Fettsäuren, das heißt von Fettsäuren, die nicht in der Natur vorkommen,
- Synthese der mehrfach ungesättigten Fettsäuren vorteilhaft nur in den Triglyceriden.

**[0023]** Um eine Anreicherung der Nahrung und des Futters mit diesen mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu ermöglichen, besteht daher ein großer Bedarf an einem einfachen, kostengünstigen Verfahren zur Herstellung dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren speziell in eukaryontischen Systemen.

**[0024]** Es bestand daher die Aufgabe ein einfaches, kostengünstiges Verfahren zu entwickeln, das möglichst viele der oben genannten vorteilhaften Eigenschaften aufweist. Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen in transgenen Pflanzen mit einem Gehalt von mindestens 15 Gew.-% bezogen auf den Gesamttriglyceridgehalt der transgenen Pflanze, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:

- a) Einbringen eines Nukleinsäurekonstrukts in die transgene Pflanze, das Nukleinsäuresequenzen enthält, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase, eine  $\Delta$ -6-Elongase und eine  $\Delta$ -5-Desaturase codiert, oder
- b) Einbringen eines Nukleinsäurekonstrukts in die transgene Pflanze, das Nukleinsäuresequenzen enthält, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase, eine  $\Delta$ -6-Elongase, eine  $\Delta$ -5-Desaturase, eine  $\Delta$ -12-Desaturase und  $\omega$ -3-Desaturase codiert, oder
- c) Einbringen eines Nukleinsäurekonstrukts in die transgene Pflanze, das Nukleinsäuresequenzen enthält, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase, eine  $\Delta$ -6-Elongase, eine  $\Delta$ -5-Desaturase, eine  $\Delta$ -5-Elongase und  $\Delta$ -4-Desaturase codiert, oder
- d) Einbringen eines Nukleinsäurekonstrukts in die transgene Pflanze, das Nukleinsäuresequenzen enthält, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase, eine  $\Delta$ -6-Elongase, eine  $\Delta$ -5-Desaturase, eine  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase, eine  $\Delta$ -12-Desaturase und  $\omega$ -3-Desaturase codiert, und
- e) Gewinnung der Öle oder Lipide aus den Pflanzen, gelöst.

**[0025]** Vorteilhaft enthalten die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mindestens vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Besonders vorteilhaft enthalten die Fettsäuren fünf oder sechs Doppelbindungen. Vorteilhaft werden gesättigte Fettsäuren mit den im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren wenig oder gar nicht umgesetzt. Unter wenig ist zu verstehen, das im Vergleich zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren die gesättigten Fettsäuren mit weniger als 5 % der Aktivität, vorteilhaft weniger als 3 %, besonders vorteilhaft mit weniger als 2 %, ganz besonders bevorzugt mit weniger als 1; 0,5; 0,25 oder 0,125 % umgesetzt werden. Diese hergestellten Fettsäuren können als einziges Produkt im Verfahren hergestellt werden oder in einem Fettsäuregemisch vorliegen.

**[0026]** Bei den im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen handelt es sich um isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren.

**[0027]** Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren, verwendet ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25.

**[0028]** Besonders vorteilhaft handelt es sich bei den im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen um die Fettsäuren Arachidonsäure (= ARA), Eicosapentaensäure (= EPA) oder Docosahexaensäure (= DHA). In einer vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens handelt es sich bei der mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen um Arachidonsäure handelt. In einer anderen vorteilhaften Ausführungsform werden als mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen Eicosapentaensäure oder Docosahexaensäure oder deren Mischungen hergestellt. Auch Mischungen von ARA, EPA und DHA sind nach dem erfindungsgemäßen Verfahren herstellbar.

**[0029]** Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren Arachidonsäure oder die Eicosapentaensäure mit einem Gehalt von mindestens 15, 16, 17, 18, 19 oder 20 Gew.-%, bevorzugt von 25, 30, 35 oder 40 Gew.-%, besonders bevorzugt von 45, 50, 55 oder 60 Gew.-% bezogen auf den Gesamttriglyceridgehalt in der transgenen Pflanze hergestellt.

**[0030]** In einer anderen vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens wird Docosahexaensäure mit einem Gehalt von mindestens 4, 5 oder 6 Gew.-%, vorteilhaft mit einem Gehalt von 7, 8, 9 oder 10 Gew.-% bezogen auf den Gesamtriglyceridgehalt in der transgenen Pflanze hergestellt.

**[0031]** Besonders vorteilhaft sollten im erfindungsgemäßen Verfahren in den Triglyceriden weniger als 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 oder 0,1 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 0,09; 0,08; 0,07; 0,06 oder 0,05 Gew.-%, besonders vorteilhaft weniger als 0,04; 0,03; 0,02 oder 0,01 Gew.-% bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt der Triglyceride einer mehrfach ungesättigten Fettsäure ausgewählt aus der Gruppe der C22:4<sup>Δ7,10,13,16</sup>-C22:5<sup>Δ4,7,10,13,16</sup>- oder C22:5<sup>Δ7,10,13,16,19</sup>-Fettsäure vorhanden sein.

**[0032]** Die im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind vorteilhaft in Triacylglyceriden gebunden, können aber auch als freie Fettsäuren oder aber gebunden in Form anderer Fettsäureester in den Organismen vorkommen. Dabei können sie als "Reinprodukte" oder aber vorteilhaft in Form von Mischungen verschiedener Fettsäuren oder Mischungen unterschiedlicher Glyceride vorliegen.

**[0033]** Im erfindungsgemäßen Verfahren werden vorteilhaft Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremolekülen mit mindestens vier Doppelbindungen im Fettsäureester, vorteilhaft mit mindestens fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäureester hergestellt. Dies führt zur Synthese von ω-3-Eicosatetraensäure (= ETA, C20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>), Arachidonsäure (ARA, C20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>), Eicosapentaensäure (EPA, C20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>), ω-6-Docosapentaensäure (C22:5<sup>Δ4,7,10,13,16</sup>) ω-6-Docosatetraensäure (C22:4<sup>Δ7,10,13,16</sup>), ω-3-Docosapentaensäure (= DPA, C22:5<sup>Δ7,10,13,16,19</sup>), Docosahexaensäure (= DHA, C22:6<sup>Δ4,7,13,13,16,19</sup>) oder deren Mischungen, bevorzugt werden ARA, EPA und/oder DHA hergestellt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens werden ω-6-Fettsäuren vorteilhaft Arachidonsäure hergestellt. In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform werden, ω-3-Fettsäuren wie EPA und/oder DHA hergestellt.

**[0034]** Besonders vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren, wie oben beschrieben, mehrfach ungesättigte Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe ω-6-Docosatetraensäure C22:4<sup>Δ7,10,13,16</sup>, ω-6-Docosapentaensäure C22:5<sup>Δ4,7,10,13,16</sup> oder ω-3-Docosapentaensäure C22:5<sup>Δ7,10,13,16,19</sup> in den Triglyceriden mit weniger als 0,5 Gew.-% bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt der Triglyceride hergestellt.

**[0035]** Die Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremolekülen können aus den Organismen, die für die Herstellung der Fettsäureester verwendet wurden, in Form eines Öls oder Lipids beispielsweise in Form von Verbindungen wie Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide wie Glycosphingolipide, Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol oder Diphosphatidylglycerol, Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Fettsäureester wie die Acetyl-CoenzymA-Ester, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens vier, fünf oder sechs bevorzugt fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten, isoliert werden, vorteilhaft werden sie in der Form ihrer Diacylglyceride, Triacylglyceride und/oder in Form des Phosphatidylcholin isoliert, besonders bevorzugt in der Form der Triacylglyceride. Neben diesen Estern sind die mehrfach ungesättigten Fettsäuren auch als freie Fettsäuren oder gebunden in anderen Verbindungen in den Organismen vorteilhaft den Pflanzen enthalten. In der Regel liegen die verschiedenen vorgenannten Verbindungen (Fettsäureester und frei Fettsäuren) in den Organismen in einer ungefähren Verteilung von 80 bis 90 Gew.-% Triglyceride, 2 bis 5 Gew.-% Diglyceride, 5 bis 10 Gew.-% Monoglyceride, 1 bis 5 Gew.-% freie Fettsäuren, 2 bis 8 Gew.-% Phospholipide vor, wobei sich die Summe der verschiedenen Verbindungen zu 100 Gew.-% ergänzt.

**[0036]** Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die hergestellten LCPUFAs wie Arachidonsäure und Eicosapentaensäure mit einem Gehalt von mindestens 15 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 16 oder 17 Gew.-%, bevorzugt von mindestens 18, 19 oder 20 Gew.-%, besonders bevorzugt von mindestens 21, 22, 23, 24 oder 25 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt von mindestens 26, 27, 28, 29 oder 30 Gew.-% bezogen auf die gesamten Fettsäuren in den transgenen Organismen vorteilhaft in einer transgenen Pflanze hergestellt. Dabei werden vorteilhaft C<sub>18</sub>- und/oder C<sub>20</sub>-Fettsäuren, die in den Wirtsorganismen vorhanden sind, zu mindestens 10 %, vorteilhaft zu mindestens 20 %, besonders vorteilhaft zu mindestens 30 %, ganz besonders vorteilhaft zu mindestens 40 % in die entsprechenden Produkte wie ARA, EPA und/oder DHA umgesetzt. Vorteilhaft werden die Fettsäuren in gebundener Form hergestellt. Mit Hilfe der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren lassen sich diese ungesättigten Fettsäuren an sn1-, sn2- und/oder sn3-Position der vorteilhaft hergestellten Triglyceride bringen. Da im erfindungsgemäßen Verfahren von den Ausgangsverbindungen Linolsäure (C18:2) bzw. Linolensäure (C18:3) mehrere Reaktionsschritte durchlaufen werden, fallen die Endprodukte des Verfahrens wie beispielsweise Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA) oder Docosapentaensäure (DHA) nicht als absolute Reinprodukte an, es sind immer auch geringe Spuren der Vor-

stufen im Endprodukt enthalten. Sind in dem Ausgangsorganismus bzw. in der Ausgangspflanze beispielsweise sowohl Linolsäure als auch Linolensäure vorhanden, so liegen die Endprodukte wie ARA, EPA oder DHA in der Regel als Mischungen vor. Die Vorstufen Linolsäure und/oder Linolensäure sollten vorteilhaft nicht mehr als 20 Gew.-%, bevorzugt nicht mehr als 15 Gew.-%, besonders bevorzugt nicht als 10 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt nicht mehr als 5 Gew.-% bezogen auf die Menge des jeweiligen Endproduktes betragen. Vorteilhaft werden in einer transgenen Pflanze als Endprodukte nur ARA, ARA und EPA, EPA und DHA oder nur DHA im erfindungsgemäßen Verfahren gebunden oder als freie Säuren hergestellt. Werden die Verbindungen ARA, EPA und DHA gleichzeitig hergestellt, werden sie vorteilhaft in einem Verhältnis von mindestens 1:1:2 (EPA:ARA:DHA), vorteilhaft von mindestens 1:1:3, bevorzugt von 1:1:4, besonders bevorzugt von 1:1:5 hergestellt. Werden ARA und EPA im Verfahren hergestellt, so werden sie vorteilhaft in einem Verhältnis von mindestens 5:1 bis mindestens 1:5 hergestellt. Werden im Verfahren EPA und DHA hergestellt, so werden sie vorteilhaft in einem Verhältnis von mindestens 5:1 bis mindestens 1:5 hergestellt.

**[0037]** Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, enthalten vorteilhaft 6 bis 15 % Palmitinsäure, 1 bis 6 % Stearinsäure; 7–85 % Ölsäure; 0,5 bis 8 % Vaccensäure, 0,1 bis 1 % Arachinsäure, 7 bis 25 % gesättigte Fettsäuren, 8 bis 85 % einfach ungesättigte Fettsäuren und 60 bis 85 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren jeweils bezogen auf 100 % und auf den Gesamtfettsäuregehalt der Organismen. Als vorteilhafte mehrfach ungesättigte Fettsäure sind in den Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische bevorzugt mindestens 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 oder 1 % bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt an Arachidonsäure enthalten. Weiterhin enthalten die Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, vorteilhaft Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe der Fettsäuren Erucasäure (13-Docosaensäure), Sterculinsäure (9,10-Methylene octadec-9-enonsäure), Malvalinsäure (8,9-Methylen Heptadec-8-enonsäure), Chaulmoogrinsäure (Cyclopentendodecansäure), Furan-Fettsäure (9,12-Epoxy-octadeca-9,11-dienonsäure), Vernonsäure (9,10-Epoxyoctadec-12-enonsäure), Tarinsäure (6-Octadecynonsäure), 6-Nonadecynonsäure, Santalbinsäure (t11-Octadecen-9-ynoic acid), 6,9-Octadecenynonsäure, Pyrulinsäure (t10-Heptadecen-8-ynonsäure), Crepenyninsäure (9-Octadecen-12-ynonsäure), 13,14-Dihydrooropheinsäure, Octadecen-13-ene-9,11-diyonsäure, Petrosensäure (cis-6-Octadecenonsäure), 9c,12t-Octadecadiensäure, Calendulasäure (8t10t12c-Octadecatriensäure), Catalpinsäure (9t11t13c-Octadecatriensäure), Eleosterinsäure (9c11t13t-Octadecatriensäure), Jacarinsäure (8c10t12c-Octadecatriensäure), Punicinsäure (9c11t13c-Octadecatriensäure), Parinarinsäure (9c11t13t15c-Octadecatetraensäure), Pinolensäure (all-cis-5,9,12-Octadecatriensäure), Laballensäure (5,6-Octadecadienallensäure), Ricinolsäure (12-Hydroxyölsäure) und/oder Coriolsäure (13-Hydroxy-9c,11t-Octadecadienonsäure). Die vorgenannten Fettsäuren kommen in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemischen in der Regel vorteilhaft nur in geringen Mengen vor, das heißt sie kommen bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 30 %, bevorzugt zu weniger als 25 %, 24 %, 23 %, 22 % oder 21 %, besonders bevorzugt zu weniger als 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % oder 5 %, ganz besonders bevorzugt zu weniger als 4 %, 3 %, 2 % oder 1 % vor. Vorteilhaft enthalten die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische weniger als 0,1 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren oder keine Buttersäure, kein Cholesterin, keine Clupanodonsäure (= Docosapentaensäure, C22:5<sup>Δ4,8,12,15,21</sup>) sowie keine Nisinsäure (Tetracosahexaensäure, C23:6<sup>Δ3,8,12,15,18,21</sup>).

**[0038]** Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bzw. im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen kann eine Steigerung der Ausbeute an mehrfach ungesättigten Fettsäuren von mindestens 50 %, vorteilhaft von mindestens 80 %, besonders vorteilhaft von mindestens 100 %, ganz besonders vorteilhaft von mindestens 150 % gegenüber der nicht transgenen Pflanze wie Arabidopsis, Lein, Raps, Soja oder Camelina beim Vergleich in der GC-Analyse erreicht werden.

**[0039]** Auch chemisch reine mehrfach ungesättigte Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind nach den vorbeschriebenen Verfahren darstellbar. Dazu werden die Fettsäuren oder die Fettsäurezusammensetzungen aus der Pflanze in bekannter Weise beispielsweise über Extraktion, Destillation, Kristallisation, Chromatographie oder Kombinationen dieser Methoden isoliert. Diese chemisch reinen Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind für Anwendungen im Bereich der Lebensmittelindustrie, der Kosmetikindustrie und besonders der Pharmaindustrie vorteilhaft.

**[0040]** Als Organismus für die Herstellung im erfindungsgemäßen Verfahren kommen prinzipiell alle Pflanzen in Frage. Vorteilhaft werden Ölfruchtpflanzen oder Nutzpflanzen im Verfahren verwendet.

**[0041]** Als Pflanzen kommen prinzipiell alle Pflanzen in Frage, die in der Lage sind Fettsäuren zu synthetisieren wie alle dicotylen oder monokotylen Pflanzen, Algen oder Moose. Vorteilhaft Pflanzen sind ausgewählt aus

der Gruppe der Pflanzenfamilien Adelotheceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Cryptocodiniaceae, Cucurbitaceae, Ditrichaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Juglandaceae, Lauraceae, Leguminosae, Linaceae, Prasinophyceae oder Gemüsepflanzen oder Zierpflanzen wie Tagetes in Betracht.

**[0042]** Beispielhaft seien die folgenden Pflanzen genannt ausgewählt aus der Gruppe: qAdelotheceae wie die Gattungen Physcomitrella z. B. die Gattung und Arten Physcomitrella patens, Anacardiaceae wie die Gattungen Pistacia, Mangifera, Anacardium z. B. die Gattung und Arten Pistacia vera [Pistazie], Mangifera indica [Mango] oder Anacardium occidentale [Cashew], Asteraceae wie die Gattungen Calendula, Carthamus, Centaurea, Cichorium, Cynara, Helianthus, Lactuca, Locusta, Tagetes, Valeriana z. B. die Gattung und Arten Calendula officinalis [Garten-Ringelblume], Carthamus tinctorius [Färberdistel, safflower], Centaurea cyanus [Kornblume], Cichorium intybus [Wegwarte], Cynara scolymus [Artichoke], Helianthus annuus [Sonnenblume], Lactuca sativa, Lactuca crispera, Lactuca esculenta, Lactuca scariola L. ssp. sativa, Lactuca scariola L. var. integrata, Lactuca scariola L. var. integrifolia, Lactuca sativa subsp. romana, Locusta communis, Valeriana locusta [Salat], Tagetes lucida, Tagetes erecta oder Tagetes tenuifolia [Studentenblume], Apiaceae wie die Gattung Daucus z. B. die Gattung und Art Daucus carota [Karotte], Betulaceae wie die Gattung Corylus z. B. die Gattungen und Arten Corylus avellana oder Corylus colurna [Haselnuss], Boraginaceae wie die Gattung Borago z. B. die Gattung und Art Borago officinalis [Borretsch], Brassicaceae wie die Gattungen Brassica, Camelina, Melanosinapis, Sinapis, Arabidopsis z. B. die Gattungen und Arten Brassica napus, Brassica rapa ssp. [Raps], Sinapis arvensis Brassica juncea, Brassica juncea var. juncea, Brassica juncea var. crispifolia, Brassica juncea var. foliosa, Brassica nigra, Brassica sinapioides, Camelina sativa, Melanosinapis communis [Senf], Brassica oleracea [Futterrübe] oder Arabidopsis thaliana, Bromeliaceae wie die Gattungen Anana, Bromelia (Ananas) z.B. die Gattungen und Arten Anana comosus, Ananas ananas oder Bromelia comosa [Ananas], Caricaceae wie die Gattung Carica wie die Gattung und Art Carica papaya [Papaya], Cannabaceae wie die Gattung Cannabis wie die Gattung und Art Cannabis sativa [Hanf], Convolvulaceae wie die Gattungen Ipomea, Convolvulus z.B. die Gattungen und Arten Ipomea batatas, Ipomea pandurata, Convolvulus batatas, Convolvulus tiliaceus, Ipomea fastigiata, Ipomea tiliacea, Ipomea triloba oder Convolvulus panduratus [Süßkartoffel, Batate], Chenopodiaceae wie die Gattung Beta wie die Gattungen und Arten Beta vulgaris, Beta vulgaris var. altissima, Beta vulgaris var. vulgaris, Beta maritima, Beta vulgaris var. perennis, Beta vulgaris var. conditiva oder Beta vulgaris var. esculenta [Zuckerrübe], Cryptocodiniaceae wie die Gattung Cryptocodium z.B. die Gattung und Art Cryptocodium cohnii, Cucurbitaceae wie die Gattung Cucurbita z.B. die Gattungen und Arten Cucurbita maxima, Cucurbita mixta, Cucurbita pepo oder Cucurbita moschata [Kürbis], Cymbellaceae wie die Gattungen Amphora, Cymbella, Okedenia, Phaeodactylum, Reimeria z.B. die Gattung und Art Phaeodactylum tricornutum, Ditrichaceae wie die Gattungen Ditrichaceae, Astomiopsis, Ceratodon, Chrysoblastella, Ditrichum, Distichium, Eccremidium, Lophidion, Philibertiella, Pleuridium, Saelania, Trichodon, Skottsbergia z.B. die Gattungen und Arten Ceratodon antarcticus, Ceratodon columbiae, Ceratodon heterophyllum, Ceratodon purpurascens, Ceratodon purpureus, Ceratodon purpureus ssp. convolutus, Ceratodon purpureus ssp. stenocarpus, Ceratodon purpureus var. rotundifolius, Ceratodon ratodon, Ceratodon stenocarpus, Chrysoblastella chilensis, Ditrichum ambiguum, Ditrichum brevisetum, Ditrichum crispatissimum, Ditrichum difficile, Ditrichum falcifolium, Ditrichum flexicaule, Ditrichum giganteum, Ditrichum heteromallum, Ditrichum lineare, Ditrichum lineare, Ditrichum montanum, Ditrichum montanum, Ditrichum pallidum, Ditrichum punctulatum, Ditrichum pusillum, Ditrichum pusillum var. tortile, Ditrichum rhynchostegium, Ditrichum schimperi, Ditrichum tortile, Distichium capillaceum, Distichium hagenii, Distichium inclinatum, Distichium macounii, Eccremidium floridanum, Eccremidium whiteleggei, Lophidion strictus, Pleuridium acuminatum, Pleuridium alternifolium, Pleuridium holdridgei, Pleuridium mexicanum, Pleuridium ravenelii, Pleuridium subulatum, Saelania glaucescens, Trichodon borealis, Trichodon cylindricus oder Trichodon cylindricus var. oblongus, Elaeagnaceae wie die Gattung Elaeagnus z.B. die Gattung und Art Olea europaea [Olive], Ericaceae wie die Gattung Kalmia z.B. die Gattungen und Arten Kalmia latifolia, Kalmia angustifolia, Kalmia microphylla, Kalmia polifolia, Kalmia occidentalis, Cistus chamaerhodendros oder Kalmia lucida [Berglorbeer], Euphorbiaceae wie die Gattungen Manihot, Janipha, Jatropha, Ricinus z.B. die Gattungen und Arten Manihot uflissima, Janipha manihot., Jatropha manihot., Manihot aipil, Manihot dulcis, Manihot manihot, Manihot melanobasis, Manihot esculenta [Manihot] oder Ricinus communis [Rizinus], Fabaceae wie die Gattungen Pisum, Albizia, Cathormion, Feuillea, Inga, Pithecolobium, Acacia, Mimosa, Medicago, Glycine, Dolichos, Phaseolus, Soja z.B. die Gattungen und Arten Pisum sativum, Pisum arvense, Pisum humile [Erbse], Albizia berteriana, Albizia julibrissin, Albizia lebbeck, Acacia berteriana, Acacia littoralis, Albizia berteriana, Albizzia berteriana, Cathormion berteriana, Feuillea berteriana, Inga fragrans, Pithecolobium berterianum, Pithecolobium fragrans, Pithecolobium berterianum, Pseudalbizzia berteriana, Acacia julibrissin, Acacia nemu, Albizia nemu, Feuillea julibrissin, Mimosa julibrissin, Mimosa speciosa, Sericanrda julibrissin, Acacia lebbeck, Acacia macrophylla, Albizia lebbeck, Feuillea lebbeck, Mimosa lebbeck, Mimosa speciosa [Seidenbaum], Medicago sativa, Medicago falcata, Medicago



varia [Alfalfa] *Glycine max* *Dolichos soja*, *Glycine gracilis*, *Glycine hispida*, *Phaseolus max*, *Soja hispida* oder *Soja max* [Sojabohne], *Funariaceae* wie die Gattungen *Aphanorrhagma*, *Entosthodon*, *Funaria*, *Physcomitrella*, *Physcomitrium* z.B. die Gattungen und Arten *Aphanorrhagma serratum*, *Entosthodon attenuatus*, *Entosthodon bolanderi*, *Entosthodon bonplandii*, *Entosthodon californicus*, *Entosthodon drummondii*, *Entosthodon jamesonii*, *Entosthodon leibergii*, *Entosthodon neoscoticus*, *Entosthodon rubrisetus*, *Entosthodon spathulifolius*, *Entosthodon tucsoni*, *Funaria americana*, *Funaria bolanderi*, *Funaria calcarea*, *Funaria californica*, *Funaria calvescens*, *Funaria convoluta*, *Funaria flavicans*, *Funaria groutiana*, *Funaria hygrometrica*, *Funaria hygrometrica* var. *arctica*, *Funaria hygrometrica* var. *calvescens*, *Funaria hygrometrica* var. *convoluta*, *Funaria hygrometrica* var. *muralis*, *Funaria hygrometrica* var. *utahensis*, *Funaria microstoma*, *Funaria microstoma* var. *obtusifolia*, *Funaria muhlenbergii*, *Funaria orcuttii*, *Funaria planoconvexa*, *Funaria polaris*, *Funaria ravenelii*, *Funaria rubriseta*, *Funaria serrata*, *Funaria sonorae*, *Funaria sublimbatus*, *Funaria tucsoni*, *Physcomitrella californica*, *Physcomitrella patens*, *Physcomitrella readeri*, *Physcomitrium australe*, *Physcomitrium californicum*, *Physcomitrium collenchymatum*, *Physcomitrium coloradense*, *Physcomitrium cupuliferum*, *Physcomitrium drummondii*, *Physcomitrium eurystomum*, *Physcomitrium flexifolium*, *Physcomitrium hookeri*, *Physcomitrium hookeri* var. *serratum*, *Physcomitrium immersum*, *Physcomitrium kellermanii*, *Physcomitrium megalocarpum*, *Physcomitrium pyriforme*, *Physcomitrium pyriforme* var. *serratum*, *Physcomitrium rufipes*, *Physcomitrium sandbergii*, *Physcomitrium subsphaericum*, *Physcomitrium washingtoniense*, *Geraniaceae* wie die Gattungen *Pelargonium*, *Cocos*, *Oleum* z.B. die Gattungen und Arten *Cocos nucifera*, *Pelargonium grossularioides* oder *Oleum cocois* [Kokosnuss], *Gramineae* wie die Gattung *Saccharum* z.B. die Gattung und Art *Saccharum officinarum*, *Juglandaceae* wie die Gattungen *Juglans*, *Wallia* z.B. die Gattungen und Arten *Juglans regia*, *Juglans ailanthifolia*, *Juglans sieboldiana*, *Juglans cinerea*, *Wallia cinerea*, *Juglans bixbyi*, *Juglans californica*, *Juglans hindsii*, *Juglans intermedia*, *Juglans jamaicensis*, *Juglans major*, *Juglans microcarpa*, *Juglans nigra* oder *Wallia nigra* [Walnuss], *Lauraceae* Wie die Gattungen *Persea*, *Laurus* z.B. die Gattungen und Arten *Laurus nobilis* [Lorbeer], *Persea americana*, *Persea gratissima* oder *Persea persea* [Avocado], *Leguminosae* wie die Gattung *Arachis* z.B. die Gattung und Art *Arachis hypogaea* [Erdnuss], *Linaceae* wie die Gattungen *Linum*, *Adenolinum* z.B. die Gattungen und Arten *Linum usitatissimum*, *Linum humile*, *Linum austriacum*, *Linum bienne*, *Linum angustifolium*, *Linum catharticum*, *Linum flavum*, *Linum grandiflorum*, *Adenolinum grandiflorum*, *Linum lewisii*, *Linum narbonense*, *Linum perenne*, *Linum perenne* var. *lewisii*, *Linum pratense* oder *Linum trigynum* [Lein], *Lythraeae* wie die Gattung *Punica* z.B. die Gattung und Art *Punica granatum* [Granatapfel], *Malvaceae* wie die Gattung *Gossypium* z.B. die Gattungen und Arten *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum* oder *Gossypium thurberi* [Baumwolle], *Marchantiaceae* wie die Gattung *Marchantia* z.B. die Gattungen und Arten *Marchantia berteroana*, *Marchantia foliacea*, *Marchantia macropora*, *Musaceae* wie die Gattung *Musa* z.B. die Gattungen und Arten *Musa nana*, *Musa acuminata*, *Musa paradisiaca*, *Musa* spp. [Banane], *Onagraceae* wie die Gattungen *Camissonia*, *Oenothera* z.B. die Gattungen und Arten *Oenothera biennis* oder *Camissonia brevipes* [Nachtkerze], *Palmae* wie die Gattung *Elaeis* z.B. die Gattung und Art *Elaeis guineensis* [Ölpalme], *Papaveraceae* wie die Gattung *Papaver* z.B. die Gattungen und Arten *Papaver orientale*, *Papaver rhoeas*, *Papaver dubium* [Mohn], *Pedaliaceae* wie die Gattung *Sesamum* z.B. die Gattung und Art *Sesamum indicum* [Sesam], *Piperaceae* wie die Gattungen *Piper*, *Artanthe*, *Peperomia*, *Steffensia* z.B. die Gattungen und Arten *Piper aduncum*, *Piper amalago*, *Piper angustifolium*, *Piper auritum*, *Piper betel*, *Piper cubeba*, *Piper longum*, *Piper nigrum*, *Piper retrofractum*, *Artanthe adunca*, *Artanthe elongata*, *Peperomia elongata*, *Piper elongatum*, *Steffensia elongata*. [Cayennepfeffer], *Poaceae* wie die Gattungen *Hordeum*, *Secale*, *Avena*, *Sorghum*, *Andropogon*, *Holcus*, *Panicum*, *Oryza*, *Zea* (Mais), *Triticum* z.B. die Gattungen und Arten *Hordeum vulgare*, *Hordeum jubatum*, *Hordeum murinum*, *Hordeum secalinum*, *Hordeum distichon*, *Hordeum aegiceras*, *Hordeum hexastichon.*, *Hordeum hexastichum*, *Hordeum irregulare*, *Hordeum sativum*, *Hordeum secalinum* [Gerste], *Secale cereale* [Roggen], *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida* [Hafer], *Sorghum bicolor*, *Sorghum halepense*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum vulgare*, *Andropogon drummondii*, *Holcus bicolor*, *Holcus sorghum*, *Sorghum aethiopicum*, *Sorghum arundinaceum*, *Sorghum caffrorum*, *Sorghum cernuum*, *Sorghum dochna*, *Sorghum drummondii*, *Sorghum durra*, *Sorghum guineense*, *Sorghum lanceolatum*, *Sorghum nervosum*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum subglabrescens*, *Sorghum verticilliflorum*, *Sorghum vulgare*, *Holcus halepensis*, *Sorghum miliaceum*, *Panicum mitaceum* [Hirse], *Oryza sativa*, *Oryza latifolia* [Reis], *Zea mays* [Mais] *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum* oder *Triticum vulgare* [Weizen], *Porphyridiaceae* wie die Gattungen *Chrootheca*, *Flintiella*, *Petrovanella*, *Porphyridium*, *Rhodella*, *Rhodosorus*, *Vanhoeffenia* z.B. die Gattung und Art *Porphyridium cruentum*, *Proteaceae* wie die Gattung *Macadamia* z.B. die Gattung und Art *Macadamia intergrifolia* [Macadamia], *Prasinophyceae* wie die Gattungen *Nephroselmis*, *Prasinococcus*, *Scherffelia*, *Tetraselmis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus* z.B. die Gattungen und Arten *Nephroselmis olivacea*, *Prasinococcus capsulatus*, *Scherffelia dubia*, *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis suecica*, *Mantoniella squamata*, *Ostreococcus tauri*, *Rubiaceae* wie die Gattung *Coffea* z.B. die Gattungen und Arten *Coffea* spp., *Coffea arabica*, *Coffea canephora* oder *Coffea liberica* [Kaffee], *Scrophulariaceae* wie die Gattung *Verbascum* z.B. die Gattungen und Arten *Verbascum blattaria*, *Verbascum chaixii*, *Verbascum densiflorum*, *Verbascum la-*

gurus, *Verbascum longifolium*, *Verbascum lychnitis*, *Verbascum nigrum*, *Verbascum olympicum*, *Verbascum phlomoides*, *Verbascum phoenicum*, *Verbascum pulverulentum* oder *Verbascum thapsus* [Königskerze], Solanaceae wie die Gattungen *Capsicum*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Lycopersicon* z.B. die Gattungen und Arten *Capsicum annuum*, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, *Capsicum frutescens* [Pfeffer], *Capsicum annuum* [Paprika], *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana langsdorffii*, *Nicotiana obtusifolia*, *Nicotiana quadrivalvis*, *Nicotiana repanda*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana sylvestris* [Tabak], *Solanum tuberosum* [Kartoffel], *Solanum melongena* [Aubergine] *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*, *Solanum integrifolium* oder *Solanum lycopersicum* [Tomate], Sterculiaceae wie die Gattung *Theobroma* z.B. die Gattung und Art *Theobroma cacao* [Kakao] oder Theaceae wie die Gattung *Camellia* z.B. die Gattung und Art *Camellia sinensis* [Tee].

**[0043]** Im erfindungsgemäßen Verfahren werden transgene Pflanzen wie zweikeimblättrige oder einkeimblättrige Pflanzen verwendet. Besonders vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren Ölfuchtpflanzen verwendet, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Saflor (*Carthamus tinctoria*), Mohn, Senf, Hanf, Rizinus, Olive, Sesam, Calendula, Punica, Nachtkerze, Königskerze, Distel, Wildrosen, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss oder Walnuss), oder es werden Nutzpflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Salanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten verwendet. Bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfuchtpflanzen, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Saflor, Mohn, Senf, Hanf, Rhizinus, Olive, Calendula, Punica, Nachtkerze, Kürbis, Lein, Soja, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss). Besonders bevorzugt sind C18:2- und/oder C18:3-Fettsäure reiche Pflanzen wie Sonnenblume, Färberdistel, Tabak, Königskerze, Sesam, Baumwolle, Kürbis, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Lein, Hanf, Distel oder Färberdistel. Ganz besonders bevorzugt sind Pflanzen wie Färberdistel, Sonnenblume, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Lein oder Hanf.

**[0044]** Im Prinzip können alle Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels vorteilhaft in Kombination mit der(den) erfinderischen  $\Delta$ -6-Desaturase(n),  $\Delta$ -6-Elongase(n),  $\Delta$ -5-Desaturase(n),  $\Delta$ -5-Elongase(n),  $\Delta$ -4-Desaturase(n),  $\Delta$ -12-Desaturase(n) und/oder  $\omega$ -3-Desaturase(n) [im Sinne dieser Anmeldung soll der Plural den Singular und umgekehrt beinhalten] im Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren verwendet werden. Vorteilhaft werden Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) in Kombination mit der  $\Delta$ -6-Desaturase(n),  $\Delta$ -6-Elongase(n),  $\Delta$ -5-Desaturase(n),  $\Delta$ -5-Elongase(n),  $\Delta$ -4-Desaturase(n),  $\Delta$ -12-Desaturase(n) und/oder  $\omega$ -3-Desaturase(n) verwendet, wobei einzelne Gene oder mehrere Gene in Kombination verwendet werden können.

**[0045]** Neben der Produktion der Ausgangsfettsäuren für die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase und eine  $\omega$ -3-Desaturase direkt im Organismus können die Fettsäuren auch von außen gefüttert werden. Aus Kostengründen ist die Produktion im Organismus bevorzugt. Bevorzugte Substrate sind die Linolsäure (C18:2<sup>A9,12</sup>), und/oder die  $\gamma$ -Linolensäure (C18:3<sup>A6,9,12</sup>).

**[0046]** Zur Steigerung der Ausbeute im beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem vorteilhaft erhöhten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist es vorteilhaft die Menge an Ausgangsprodukt für die Fettsäuresynthese zu steigern, dies kann beispielsweise durch das Einbringen einer Nukleinsäure in den Organismus, die für ein Polypeptid mit  $\Delta$ -12-Desaturase codiert, erreicht werden. Vorteilhaft setzt die erfindungsgemäße Verfahren verwendete  $\Delta$ -12-Desaturase Ölsäure (C18:1<sup>A9</sup>) zu Linolsäure (C18:2<sup>A9,12</sup>) oder C18:2<sup>A6,9</sup> zu C18:3<sup>A6,9,12</sup> (= GLA) um. Dadurch werden die Ausgangsprodukte Linolsäure (C18:2<sup>A9,12</sup>) und  $\gamma$ -Linolensäure (C18:3<sup>A6,9,12</sup>) für die Synthese der mehrfach ungesättigten Fettsäuren verstärkt zu Verfügung gestellt. Dies ist besonders vorteilhaft in Öl-produzierenden Organismen wie der Familie der Brassicaceae wie der Gattung *Brassica* z.B. Raps; der Familie der Elaeagnaceae wie die Gattung *Elaeagnus* z.B. die Gattung und Art *Olea europaea* oder der Familie Fabaceae wie der Gattung *Glycine* z.B. die Gattung und Art *Glycine max*, die einen hohen Ölsäuregehalt aufweisen. Da diese Organismen nur einen geringen Gehalt an Linoisäure aufweisen (Mikoklajczak et al., Journal of the American Oil Chemical Society, 38, 1961, 678–681) ist die Verwendung der genannten  $\Delta$ -12-Desaturasen zur Herstellung des Ausgangsprodukts Linolsäure vorteilhaft.

**[0047]** Im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren stammen vorteilhaft aus Pflanzen wie Algen beispielsweise Algen der Familie der Prasinophyceae wie aus den Gattungen *Heteromastix*, *Mammella*, *Mantoniella*, *Micromonas*, *Nephroselmis*, *Ostreococcus*, *Prasinocladus*, *Prasinococcus*, *Pseudoscourfielda*, *Pycnococcus*, *Pyramimonas*, *Scherffelia* oder *Tetraselmis* wie den Gattungen und Arten *Heteromastix longifillialis*, *Mamiella gilva*, *Mantoniella squamata*, *Micromonas pusilla*, *Nephroselmis olivacea*, *Nephroselmis pyriformis*, *Nephroselmis rotunda*, *Ostreococcus tauri*, *Ostreococcus* sp. *Prasinocladus ascus*, *Prasinocladus lubricus*, *Pycnococcus provasolii*, *Pyramimonas amyliifera*, *Pyramimonas disomata*, *Pyramimonas obovata*, *Pyramimonas orientalis*, *Pyramimonas parkeae*, *Pyramimonas spinifera*, *Pyramimonas* sp., *Tetraselmis apiculata*, *Tetraselmis carteriaformis*, *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis convolutae*, *Tetraselmis desikacharyi*, *Tetraselmis gracilis*, *Tetraselmis hazeni*, *Tetraselmis impellucida*, *Tetraselmis inconspicua*, *Tetraselmis levis*, *Tetraselmis maculata*, *Tetraselmis marina*, *Tetraselmis striata*, *Tetraselmis subcordiformis*, *Tetraselmis suecica*, *Tetraselmis tetrabrachia*, *Tetraselmis tetrathele*, *Tetraselmis verrucosa*, *Tetraselmis verrucosa* fo. *Rubens* oder *Tetraselmis* sp. vorteilhaft stammen die verwendeten Nukleinsäuren aus Algen der Gattung *Ostreococcus*. Weitere vorteilhafte Organismen sind Diatomeen wie *Thalassiosira*, *Phaeodactylum* oder *Thraustochytrium* oder Pilze wie *Thraustochytrium* oder *Phytophthora*.

**[0048]** Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen oder deren Derivat oder Homologe, die für Polypeptide codieren, die noch die enzymatische Aktivität der durch Nukleinsäuresequenzen codierten Proteine besitzen. Diese Sequenzen werden einzeln oder in Kombination mit den für die  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase codierenden Nukleinsäuresequenzen in Expressionskonstrukte cloniert und zum Einbringen und zur Expression in den Pflanzen verwendet. Diese Expressionskonstrukte ermöglichen durch ihre Konstruktion eine vorteilhafte optimale Synthese der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

**[0049]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens einer Zelle oder einer ganzen Pflanze, die die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen enthält, wobei die Zelle und/oder die Pflanze mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, die für die  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase codiert, einem Genkonstrukt oder einem Vektor wie nachfolgend beschrieben, allein oder in Kombination mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels codieren, transformiert wird. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens der Öle, Lipide oder freien Fettsäuren aus der Zelle oder Pflanze. Bei der Kultur kann es sich beispielsweise um eine Fermentationskultur beispielsweise im Falle der Kultivierung von Pflanzenzellen oder um eine Treibhaus oder Feldkultur einer Pflanze handeln. Die so hergestellte Zelle oder die so hergestellte Pflanze ist vorteilhaft eine Zelle eines Öl-produzierenden Organismus wie einer Ölfruchtpflanze wie beispielsweise Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Erdnuss, Soja, Safflower, Hanf, Sonnenblumen oder Borretsch.

**[0050]** Unter Anzucht ist beispielsweise die Kultivierung im Falle von Pflanzenzellen, -gewebe oder -organe auf oder in einem Nährmedium oder der ganzen Pflanze auf bzw. in einem Substrat beispielsweise in Hydrokultur, Blumentopferde oder auf einem Ackerboden zu verstehen.

**[0051]** "Transgen" bzw. "Rekombinant" im Sinne der Erfindung bedeutet bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette (= Genkonstrukt) oder einem Vektor enthaltend die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustande gekommenen Konstruktionen, in denen sich entweder

- a) die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, oder
- b) eine mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
- c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertion eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen genomischen bzw. chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vor-

kommende Expressionskassette – beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des natürlichen Promotors der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen mit den entsprechenden  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturasegenen – wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beispielsweise beschrieben in US 5,565,350 oder WO 00/15815.

**[0052]** Unter transgenen Pflanzen im Sinne der Erfindung ist wie vorgenannt 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.

**[0053]** Als Wirtsorganismen für die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die Expressionskassette oder den Vektor eignen sich prinzipiell vorteilhaft alle Pflanzen, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielfhaft seien Pflanzen wie Arabidopsis, Asteraceae wie Calendula oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuss, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, FärberSaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne. Bevorzugt werden Pflanzen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, FärberSaflor, Flachs, Hanf, Rizinus, Calendula, Erdnuss, Kakaobohne oder Sonnenblume.

**[0054]** Zu den Pflanzen im Sinne der Erfindung gehören Pflanzenzellen und bestimmte Gewebe, Organe und Teile von Pflanzen in all ihren Erscheinungsformen, wie Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotelydonen, Petiolen, Erntematerial, pflanzliches Gewebe, reproduktives Gewebe und Zellkulturen, das von der eigentlichen transgenen Pflanze abgeleitet ist und/oder dazu verwendet werden kann, die transgene Pflanze hervorzubringen.

**[0055]** Transgene Pflanzen, die die im erfindungsgemäßen Verfahren synthetisierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthalten, können vorteilhaft direkt vermarktet werden ohne dass die synthetisierten Öle, Lipide oder Fettsäuren isoliert werden müssen. Unter Pflanzen im erfindungsgemäßen Verfahren sind ganze Pflanzen sowie alle Pflanzenteile, Pflanzenorgane oder Pflanzenteile wie Blatt, Stiel, Samen, Wurzel, Knollen, Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, 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 Organismen vorteilhaft 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 Organismen entweder aus der Kultur, in der sie wachsen, oder vom Feld ernten. Dies kann über Pressen oder Extraktion der Pflanzenteile bevorzugt der Pflanzensamen erfolgen. Dabei können die Öle, Fette, Lipide und/oder freien Fettsäuren durch sogenanntes kalt schlagen oder kalt pressen ohne Zuführung von Wärme durch Pressen gewonnen werden. Damit sich die Pflanzenteile speziell die Samen leichter aufschließen lassen, werden sie vorher zerkleinert, gedämpft oder geröstet. Die so vorbehandelten Samen können anschließend gepresst werden oder mit Lösungsmittel wie 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.

**[0056]** Eine erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung der Öle, Lipide, der Fettsäuren und/oder der Fettsäurezusammensetzung, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden oder die

durch Mischung dieser Öle, Lipide und/oder Fettsäuren mit tierischen, mikrobiellen oder pflanzlichen Ölen, Lipiden oder Fettsäuren erhalten wurden, in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika. Die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Öle, Lipide, Fettsäuren können in der dem Fachmann bekannten Weise zur Abmischung mit anderen Ölen, Lipiden, Fettsäuren oder Fettsäuregemischen tierischen Ursprungs wie z.B. Fischölen verwendet werden.

**[0057]** Unter dem Begriff "Öl", "Lipid" oder "Fett" wird ein Fettsäuregemisch verstanden, das ungesättigte, gesättigte, vorzugsweise veresterte Fettsäure(n), vorteilhaft in Triglyceride gebunden, enthält. Bevorzugt ist, dass das Öl, Lipid oder Fett einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten freien oder vorteilhaft veresterten Fettsäure(n), insbesondere Linolsäure,  $\gamma$ -Linolensäure, Dihomo- $\gamma$ -linolensäure, Arachidonsäure,  $\alpha$ -Linolensäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure, besonders vorteilhaft Arachidonsäure, Eicosapentaensäure oder Docosahexaensäure hat. Vorzugsweise ist der Anteil an ungesättigten veresterten Fettsäuren ungefähr 30 %, mehr bevorzugt ist ein Anteil von 50 %, noch mehr bevorzugt ist ein Anteil von 60 %, 70 %, 80 % oder mehr. Zur Bestimmung kann z.B. der Anteil an Fettsäure nach Überführung der Fettsäuren in die Methylestern durch Umesterung gaschromatographisch bestimmt werden. Das Öl, Lipid oder Fett kann verschiedene andere gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, z.B. Calendulasäure, Palmitin-, Palmitolein-, Stearin-, Ölsäure etc., enthalten. Insbesondere kann je nach Ausgangsorganismus der Anteil der verschiedenen Fettsäuren in dem Öl oder Fett schwanken.

**[0058]** Bei den im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit vorteilhaft mindestens vier Doppelbindungen handelt es sich wie oben beschrieben beispielsweise um Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide, Monoacylglyceride, Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Fettsäureester, bevorzugt um Triacylglyceride.

**[0059]** Aus den so im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit vorteilhaft mindestens fünf oder sechs Doppelbindungen lassen sich die enthaltenden mehrfach ungesättigten 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.

**[0060]** Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren können nach Einbringung in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanzenzelle bzw. Pflanze entweder auf einem separaten Plasmid liegen oder vorteilhaft in das Genom der Wirtszelle integriert sein. Bei Integration in das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein oder durch derartige Rekombination erfolgen, dass das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt wird, wodurch die Produktion der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert wird, oder durch Verwendung eines Gens in trans, so dass das Gen mit einer funktionellen Expressionseinheit, welche mindestens eine die Expression eines Gens gewährleistende Sequenz und mindestens eine die Polyadenylierung eines funktionell transkribierten Gens gewährleistende Sequenz enthält, funktionell verbunden ist. Vorteilhaft werden die Nukleinsäuren über Multiexpressionskassetten oder Konstrukte zur multiparallelen Expression in die Organismen vorteilhaft zur multiparallelen samenspezifischen Expression von Genen in die Pflanzen gebracht.

**[0061]** Moose und Algen sind die einzigen bekannten Pflanzensysteme, die erhebliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) herstellen. Moose enthalten PUFAs in Membranlipiden während Algen, algenverwandte Organismen und einige Pilze auch nennenswerte Mengen an PUFAs in der Triacylglycerolfraktion akkumulieren. Daher eignen sich Nukleinsäuremoleküle, die aus solchen Stämmen isoliert werden, die PUFAs auch in der Triacylglycerolfraktion akkumulieren, besonders vorteilhaft für das erfindungsgemäße Verfahren und damit zur Modifikation des Lipid- und PUFA-Produktionssystems in einem Wirt, insbesondere Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, beispielsweise Raps, Canola, Lein, Hanf, Soja, Sonnenblumen, Borretsch. Sie sind deshalb vorteilhaft im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbar.

**[0062]** Als Substrate der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und  $\omega$ -3-Desaturase-Aktivität codieren, und/oder den weiteren verwendeten Nukleinsäuren wie den Nukleinsäuren, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fett-

säure-Acetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) codieren eignen sich vorteilhaft C<sub>16</sub>-, C<sub>18</sub>- oder C<sub>20</sub>-Fettsäuren. Bevorzugt werden die im Verfahren als Substrate umgesetzten Fettsäuren in Form ihrer Acyl-CoA-Ester und/oder ihrer Phospholipid-Ester umgesetzt.

**[0063]** Zur Herstellung der erfindungsgemäßen langkettigen PUFAs müssen die mehrfach ungesättigten C<sub>18</sub>-Fettsäuren zunächst durch die enzymatische Aktivität einer Desaturase zunächst desaturiert und anschließend über eine Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert werden. Nach einer Elongationsrunde führt diese Enzymaktivität zu C<sub>20</sub>-Fettsäuren, und nach zwei Elongationsrunden zu C<sub>22</sub>-Fettsäuren. Die Aktivität der erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Desaturasen und Elongasen führt zu C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, bevorzugt zu C<sub>20</sub>-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen, besonders bevorzugt zu C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens fünf oder sechs Doppelbindungen, ganz besonders bevorzugt mit sechs Doppelbindungen im Molekül. Besonders bevorzugt als Produkte des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure. Die C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße enzymatische Aktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglycerin, Diacylglycerin oder Triacylglycerin, verlängert werden.

**[0064]** Der bevorzugte Biosyntheseort von Fettsäuren, Ölen, Lipiden oder Fette in den vorteilhaft verwendeten Pflanzen ist beispielsweise im allgemeinen der Samen oder Zellschichten des Samens, so dass eine samenspezifische Expression der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, dass die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden nicht auf das Samengewebe beschränkt sein muss, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze – beispielsweise in Epidermiszellen oder in den Knollen – gewebespezifisch erfolgen kann.

**[0065]** Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase, eine  $\Delta$ -6-Elongase, eine  $\Delta$ -5-Desaturase, eine  $\Delta$ -12-Desaturase und eine  $\omega$ -3-Desaturase codieren, können im Verfahren die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens um 5 %, bevorzugt mindestens um 10 %, besonders bevorzugt mindestens um 20 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 50 % gegenüber der Wildtyppflanze, die die Nukleinsäuren nicht rekombinant enthalten, erhöht werden.

**[0066]** Durch das erfindungsgemäße Verfahren können die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den im Verfahren verwendeten Pflanzen prinzipiell auf zwei Arten erhöht werden. Es kann vorteilhaft der Pool an freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren und/oder der Anteil der über das Verfahren hergestellten veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren erhöht werden. Vorteilhaft wird durch das erfindungsgemäße Verfahren der Pool an veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den transgenen Pflanze erhöht.

**[0067]** Die im Verfahren gewonnenen Fettsäuren eignen sich auch als Ausgangsmaterial für die chemische Synthese von weiteren Wertprodukten. Sie können beispielsweise in Kombination miteinander oder allein zur Herstellung von Pharmaka, Nahrungsmittel, Tierfutter oder Kosmetika verwendet werden.

**[0068]** Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Sequenz codieren, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 70 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2 codieren und eine  $\Delta$ -6-Desaturaseaktivität aufweisen.

**[0069]** Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 7 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 8 dargestellten Sequenz codieren, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 7 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 70 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 8 codieren und eine  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität aufweisen.

- [0070]** Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 9 dargestellten Sequenz,
  - b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 10 dargestellten Sequenz codieren, oder
  - c) Derivate der in SEQ ID NO: 9 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 10 codieren und eine  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität aufweisen.
- [0071]** Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 23 dargestellten Sequenz,
  - b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 24 dargestellten Sequenz codieren, oder
  - c) Derivate der in SEQ ID NO: 23 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 24 codieren und eine  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität aufweisen.
- [0072]** Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 25 dargestellten Sequenz, oder
  - b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 26 dargestellten Sequenz codieren, oder
  - c) Derivate der in SEQ ID NO: 25 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 26 codieren und eine  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität aufweisen.
- [0073]** Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind Genkonstrukte, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 enthalten, wobei die Nukleinsäure funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist. Zusätzlich können weitere 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, Alloxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) im Genkonstrukt enthalten sein. Vorteilhaft sind zusätzlich Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe der  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -9-Elongase oder  $\Delta$ -5-Elongase enthalten.
- [0074]** Vorteilhaft stammen alle die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen aus einem Organismus wie einer Pflanze oder einem Mikroorganismus. Bevorzugt stammen die Nukleinsäuresequenzen aus Algen, wie *Ostreococcus*, Pilzen wie *Phytophthora* oder Diatomeen wie *Thalassiosira*.
- [0075]** Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren, werden vorteilhaft allein oder bevorzugt in Kombination in einer Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt), die die Expression der Nukleinsäuren in einer Pflanze ermöglicht, eingebracht. Es kann im Nukleinsäurekonstrukt mehr als eine Nukleinsäuresequenz einer enzymatischen Aktivität wie z.B. einer  $\Delta$ -6-Desaturase, einer  $\Delta$ -6-Elongase, einer  $\Delta$ -5-Desaturase, einer  $\Delta$ -5-Elongase, einer  $\Delta$ -4-Desaturase, einer  $\Delta$ -12-Desaturase und/oder einer  $\omega$ -3-Desaturase enthalten sein.
- [0076]** Zum Einbringen werden die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren vorteilhaft einer Amplifikation und Ligation in bekannter Weise unterworfen. Vorzugsweise geht man in Anlehnung an das Protokoll der Pfu-DNA-Polymerase oder eines Pfu/Taq-DNA-Polymerasegemisches vor. Die Primer werden in Anlehnung an die zu amplifizierende Sequenz gewählt. Zweckmäßigerweise sollten der/die Primer so gewählt werden, dass das Amplifikat die gesamte kodogene Sequenz vom Start- bis zum Stop-Kodon umfasst. Im Anschluss an die Amplifikation wird das Amplifikat zweckmäßigerweise analysiert. Beispielsweise kann die Analyse nach gelelektrophoretischer Auftrennung hinsichtlich Qualität und Quantität erfolgen. Im Anschluss kann das Amplifikat nach einem Standardprotokoll gereinigt werden (z.B. Qiagen). Ein Aliquot des gereinigten Amplifikats steht dann für die nachfolgende Klonierung zur Verfügung. Geeignete Klonierungsvektoren sind dem Fachmann allgemein bekannt. Hierzu gehören insbesondere Vektoren, die in mikrobiellen Systemen replizierbar

sind, also vor allem Vektoren, die eine effiziente Klonierung in Hefen oder Pilze gewährleisten, und die stabile Transformation von Pflanzen ermöglichen. Zu nennen sind insbesondere verschiedene für die T-DNA-vermittelte Transformation geeignete, binäre und co-integrierte Vektorsysteme. Derartige Vektorsysteme sind in der Regel dadurch gekennzeichnet, dass sie zumindest die für die Agrobakterium-vermittelte Transformation benötigten *vir*-Gene sowie die T-DNA begrenzenden Sequenzen (T-DNA-Border) beinhalten. Vorzugsweise umfassen diese Vektorsysteme auch weitere cis-regulatorische Regionen wie Promotoren und Terminatoren und/oder Selektionsmarker, mit denen entsprechend transformierte Organismen identifiziert werden können. Während bei co-integrierten Vektorsystemen *vir*-Gene und T-DNA-Sequenzen auf demselben Vektor angeordnet sind, basieren binäre Systeme auf wenigstens zwei Vektoren, von denen einer *vir*-Gene, aber keine T-DNA und ein zweites T-DNA, jedoch kein *vir*-Gen trägt. Dadurch sind letztere Vektoren relativ klein, leicht zu manipulieren und sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterium zu replizieren. Zu diesen binären Vektoren gehören Vektoren der Serien pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen. Erfindungsgemäß bevorzugt verwendet werden Bin 19, pBI 101, pBinAR, pGPTV und pCAMBIA. Eine Übersicht über binäre Vektoren und ihre Verwendung gibt Hellens et al, Trends in Plant Science (2000) 5, 446–451. Für die Vektorpräparation können die Vektoren zunächst mit Restriktionsendonuklease(n) linearisiert und dann in geeigneter Weise enzymatisch modifiziert werden. Im Anschluss wird der Vektor gereinigt und ein Aliquot für die Klonierung eingesetzt. Bei der Klonierung wird das enzymatisch geschnittene und erforderlichenfalls gereinigte Amplifikat mit ähnlich präparierten Vektorfragmenten mit Einsatz von Ligase kloniert. Dabei kann ein bestimmtes Nukleinsäurekonstrukt bzw. Vektor- oder Plasmidkonstrukt einen oder auch mehrere kodogene Genabschnitte aufweisen. Vorzugsweise sind die kodogenen Genabschnitte in diesen Konstrukten mit regulatorischen Sequenzen funktional verknüpft. Zu den regulatorischen Sequenzen gehören insbesondere pflanzliche Sequenzen wie die oben beschriebenen Promotoren und Terminatoren. Die Konstrukte lassen sich vorteilhafterweise in Mikroorganismen, insbesondere *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*, unter selektiven Bedingungen stabil propagieren und ermöglichen einen Transfer von heterologer DNA in Pflanzen oder Mikroorganismen.

**[0077]** Unter der vorteilhaften Verwendung von Klonierungsvektoren können die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die erfinderischen Nukleinsäuren und Nukleinsäurekonstrukte in Organismen wie Mikroorganismen oder vorteilhaft Pflanzen eingebracht werden und damit bei der Pflanzentransformation verwendet werden, wie denjenigen, die veröffentlicht sind in und dort zitiert sind: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71–119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15–38; B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128–143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205–225). Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die erfinderischen Nukleinsäuren und Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren lassen sich damit zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Organismen vorteilhaft an Pflanzen verwenden, so dass diese bessere und/oder effizientere Produzenten von PUFAs werden.

**[0078]** Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die eine Veränderung des erfindungsgemäßen  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und  $\omega$ -3-Desaturase-Proteins sowie der weiteren im Verfahren verwendeten Proteine wie die  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Proteine möglich ist, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der vorteilhaft mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einer Pflanze bevorzugt in einer Ölfruchtpflanze aufgrund dieses veränderten Proteins direkt beeinflusst werden kann. Die Anzahl oder Aktivität der  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und  $\omega$ -3-Desaturase-Proteine oder -Gene kann erhöht werden, so dass größere Mengen der Genprodukte und damit letztlich größere Mengen der im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen hergestellt werden. Auch eine de novo Synthese in einer Pflanze, der die Aktivität und Fähigkeit zur Biosynthese der Verbindungen vor dem Einbringen des/der entsprechenden Gens/Gene fehlte, ist möglich. Entsprechendes gilt für die Kombination mit weiteren Desaturasen oder Elongasen oder weiteren Enzymen aus dem Fettsäure- und Lipidstoffwechsel. Auch die Verwendung verschiedener divergenter, d.h. auf DNA-Sequenzebene unterschiedlicher Sequenzen kann dabei vorteilhaft sein bzw. die Verwendung von Promotoren zur Genexpression, die eine andere zeitliche Genexpression z.B. abhängig vom Reifegrad eines Samens oder Öl-speichernden Gewebes ermöglicht.

**[0079]** Durch das Einbringen eines  $\Delta$ -6-Desaturase-, eines  $\Delta$ -6-Elongase-, eines  $\Delta$ -5-Desaturase-, eines  $\Delta$ -5-Elongase-, eines  $\Delta$ -4-Desaturase-, eines  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder eines  $\omega$ -3-Desaturase-Genes in einer Pflanze allein oder in Kombination mit anderen Genen in eine Zelle kann nicht nur den Biosynthesefluss zum Endprodukt erhöht, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin-Zusammensetzung erhöht oder de novo geschaffen werden. Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer Gene, die am Import von Nährstoffen,



die zur Biosynthese einer oder mehrerer Fettsäuren, Ölen, polaren und/oder neutralen Lipiden nötig sind, erhöht sein, so dass die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zellen oder innerhalb des Speicherkompartiments erhöht ist, wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von PUFAs, wie im folgenden beschrieben, weiter gesteigert wird. Durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl einer oder mehrerer  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturase-Gene, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer Gene, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Pflanzen zu steigern.

**[0080]** Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten isolierten Nukleinsäuremoleküle codieren für Proteine oder Teile von diesen, wobei die Proteine oder das einzelne Protein oder Teile davon eine Aminosäuresequenz enthält, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz ist, die in den Sequenzen SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 dargestellt ist, so dass die Proteine oder Teile davon noch eine  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturase-Aktivität aufweisen. Vorzugsweise haben die Proteine oder Teile davon, die von dem Nukleinsäuremolekül/den Nukleinsäuremolekülen kodiert wird/werden, noch seine wesentliche enzymatische Aktivität und die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen oder Lipidkörperchen in Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen. Vorteilhaft sind die von den Nukleinsäuremolekülen kodierten Proteine zu mindestens etwa 40 %, vorzugsweise mindestens etwa 50 % oder 60 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr identisch zu den in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 dargestellten Aminosäuresequenzen. im Sinne der Erfindung ist unter Homologie oder homolog, Identität oder identisch zu verstehen.

**[0081]** Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für das Vergleichen verschiedener Sequenzen stehen dem Fachmann eine Reihe von Programmen, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen zur Verfügung. Dabei liefern die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351–360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151–153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443–453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482–489 (1981)), die im GCG Software-Paket [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Diese Einstellungen wurden, falls nicht anders angegeben, immer als Standardeinstellungen für Sequenzvergleiche verwendet wurden.

**[0082]** Unter wesentlicher enzymatischer Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase ist zu verstehen, dass sie gegenüber den durch die Sequenz mit SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 und deren Derivate codierten Proteinen/Enzymen im Vergleich noch mindestens eine enzymatische Aktivität von mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % und ganz besonders 40 % aufweisen und damit am Stoffwechsel von zum Aufbau von Fettsäuren, Fettsäureester wie Diacylglyceride und/oder Triacylglyceride in einer Pflanze oder Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über Membranen teilnehmen können, wobei  $C_{20}$ - oder  $C_{22}$ -Kohlenstoffketten im Fettsäuremolekül mit Doppelbindungen an mindestens vier, fünf oder sechs Stellen gemeint sind.

**[0083]** Vorteilhaft im Verfahren verwendbare Nukleinsäuren stammen aus Bakterien, Pilzen, Diatomeen, Tieren wie *Caenorhabditis* oder *Oncorhynchus* oder Pflanzen wie Algen oder Moosen wie den Gattungen *Shewanella*, *Physcomitrella*, *Thraustochytrium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Ceratodon*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Ischyria*, *Aleurita*, *Muscarioides*, *Mortierella*, *Borago*, *Phaeodactylum*, *Cryptocodium*, speziell aus den Gattungen und Arten *Oncorhynchus mykiss*, *Thalassiosira pseudonona*, *Mantoniella squamata*, *Ostreococcus sp.*, *Ostreococcus tauri*, *Euglena gracilis*, *Physcomitrella patens*, *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae*, *Fusa-*

rium gramineum, Cryptocodinium cohnii, Ceratodon purpureus, Isochrysis galbana, Aleurita farinosa, Thraustochytrium sp., Muscarioides vialii, Mortierella alpina, Borago officinalis, Phaeodactylum tricornutum, Caenorhabditis elegans oder besonders vorteilhaft aus Oncorhynchus mykiss, Thalassiosira pseudonona oder Cryptocodinium cohnii.

**[0084]** Alternativ können im erfindungsgemäßen Verfahren Nukleotidsequenzen verwendet werden, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase codieren und die an eine Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 dargestellt, vorteilhaft unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

**[0085]** Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen werden vorteilhaft in einer Expressionskassette, die die Expression der Nukleinsäuren in Organismen wie Mikroorganismen oder Pflanzen ermöglicht, eingebracht.

**[0086]** Dabei werden die Nukleinsäuresequenzen, die für die  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase codieren, mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach 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. Die Expressionskassette (= Expressionskonstrukt = 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. Die  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturase-Gene können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein. Vorteilhaft liegt nur jeweils eine Kopie der Gene in der Expressionskassette vor. Dieses Genkonstrukt oder die Genkonstrukte können zusammen in der Wirtspflanze exprimiert werden. Dabei kann das Genkonstrukt oder die Genkonstrukte in einem oder mehreren Vektoren inseriert sein und frei in der Zelle vorliegen oder aber im Genom inseriert sein. Es ist vorteilhaft für die Insertion weiterer Gene im Wirtsgenom, wenn die zu exprimierenden Gene zusammen in einem Genkonstrukt vorliegen.

**[0087]** 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.

**[0088]** Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind ein oder mehrere Genkonstrukte, die eine oder mehrere Sequenzen enthalten, die durch SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 oder dessen Derivate definiert sind und für Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 kodieren. Die genannten  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturase-Proteine führen dabei vorteilhaft zu einer Desaturierung oder Elongierung von Fettsäuren, wobei das Substrat vorteilhaft ein, zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen aufweist

und vorteilhaft 18, 20 oder 22 Kohlenstoffatome im Fettsäuremolekül aufweist. Gleiches gilt für ihre Homologen, Derivate oder Analoge, die funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen, vorteilhafterweise zur Steigerung der Genexpression, verbunden sind.

**[0089]** Vorteilhafte Regulationssequenzen, die für die Herstellung der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen und ihr anschließendes Einbringen in Pflanzen verwendet werden können, liegen beispielsweise in Promotoren vor, wie dem *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *trp-tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lpp-lac*-, *lacIq*-, *T7*-, *T5*-, *T3*-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, *SP6*-,  $\lambda$ -*PR*- oder  $\lambda$ -*PL*-Promotor und werden vorteilhafterweise in Gramnegativen Bakterien angewendet. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen liegen beispielsweise in den Gram-positiven Promotoren *amy* und *SPO2*, in den Hefe- oder Pilzpromotoren *ADC1*, *MF $\alpha$* , *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* oder in den Pflanzenpromotoren *CaMV/35S* [Franck et al., *Cell* 21 (1980) 285–294], *PRP1* [Ward et al., *Plant. Mol. Biol.* 22 (1993)], *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B33*, *nos* oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor vor. In diesem Zusammenhang vorteilhaft sind ebenfalls induzierbare Promotoren, wie die in EP-A-0 388 186 (Benzylsulfonamid-induzierbar), *Plant J.* 2, 1992:397–404 (Gatz et al., Tetracyclin-induzierbar), EP-A-0 335 528 (Abzissinsäure-induzierbar) oder WO 93/21334 (Ethanol- oder Cyclohexenol-induzierbar) beschriebenen Promotoren. Weitere geeignete Pflanzenpromotoren sind der Promotor von cytosolischer FBPase oder der ST-LSI-Promotor der Kartoffel (Stockhaus et al., *EMBO J.* 8, 1989, 2445), der Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase-Promotor aus *Glycine max* (Genbank-Zugangsnr. U87999) oder der in EP-A-0 249 676 beschriebene nodienspezifische Promotor. Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, welche die Expression in Geweben ermöglichen, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind. Ganz besonders vorteilhaft sind samenspezifische Promotoren, wie der ausführungsgemäße USP Promotor aber auch andere Promotoren wie der *LeB4*-, *DC3*, *Phaseolin*- oder *Napin*-Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promotoren, die für monokotyle oder dikotyle Pflanzen verwendet werden können und in US 5,608,152 (*Napin*-Promotor aus *Raps*), WO 98/45461 (*Oleosin*-Promotor aus *Arabidopsis*), US 5,504,200 (*Phaseolin*-Promotor aus *Phaseolus vulgaris*), WO 91/13980 (*Bce4*-Promotor aus *Brassica*), von Bäumlein et al., *Plant J.*, 2, 2, 1992:233–239 (*LeB4*-Promotor aus einer Leguminose) beschrieben sind, wobei sich diese Promotoren für Dikotyledonen eignen. Die folgenden Promotoren eignen sich beispielsweise für Monokotyledonen *lpt-2*- oder *lpt-1*-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230), *Hordein*-Promotor aus Gerste und andere, in WO 99/16890 beschriebene geeignete Promotoren.

**[0090]** Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen, wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft, zusätzlich oder alleine synthetische Promotoren zu verwenden, besonders wenn sie eine Samen-spezifische Expression vermitteln, wie z.B. beschrieben in WO 99/16890.

**[0091]** Um einen besonders hohen Gehalt an PUFAs vor in transgenen Pflanzen zu erzielen, sollten die PUFA-Biosynthesegene vorteilhaft samenspezifisch in Ölsaaten exprimiert werden. Hierzu können Samen-spezifische Promotoren verwendet werden, bzw. solche Promotoren die im Embryo und/oder im Endosperm aktiv sind. Samen-spezifische Promotoren können prinzipiell sowohl aus dikotyledonen als auch aus monokotyledonen Pflanzen isoliert werden. Im folgenden sind vorteilhafte bevorzugte Promotoren aufgeführt: USP (= unknown seed protein) und *Vicilin* (*Vicia faba*) [Bäumlein et al., *Mol. Gen. Genet.*, 1991, 225(3)], *Napin* (*Raps*) [US 5,608,152], *Acyl-Carrier Protein* (*Raps*) [US 5,315,001 und WO 92/18634], *Oleosin* (*Arabidopsis thaliana*) [WO 98/45461 und WO 93/20216], *Phaseolin* (*Phaseolus vulgaris*) [US 5,504,200], *Bce4* (WO 91/13980), *Leguminosen B4* (*LegB4*-Promotor) [Bäumlein et al., *Plant J.*, 2,2, 1992], *Lpt2* und *lpt1* (Gerste) [WO 95/15389 u. WO95/23230], Samen-spezifische Promotoren aus Reis, Mais u. Weizen [WO 99/16890], *Amy32b*, *Amy 6-6* und *Aleurain* [US 5,677,474], *Bce4* (*Raps*) [US 5,530,149], *Glycinin* (*Soja*) [EP 571 741], *Phosphoenol-Pyruvatcarboxylase* (*Soja*) [JP 06/62870], *ADR12-2* (*Soja*) [WO 98/08962], *Isocitratlyase* (*Raps*) [US 5,689,040] oder  $\alpha$ -*Amylase* (Gerste) [EP 781 849].

**[0092]** Die Pflanzengenexpression lässt sich auch über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:89–108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt.

**[0093]** Beispiele für solche Promotoren sind ein *Salicylsäure*-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein *Tetracyclin*-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) *Plant J.* 2, 397–404) und ein *Ethanol*-induzierbarer Promotor.

**[0094]** Um eine stabile Integration der Biosynthesegene in die transgene Pflanze über mehrere Generation sicherzustellen, sollte jede der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elon-

gase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase codieren, unter der Kontrolle eines eigenen bevorzugt eines unterschiedlichen Promotors exprimiert werden, da sich wiederholende Sequenzmotive zu Instabilität der T-DNA bzw. zu Rekombinationsereignissen führen können. Die Expressionskassette ist dabei vorteilhaft so aufgebaut, dass einem Promotor eine geeignete Schnittstelle zur Insertion der zu exprimierenden Nukleinsäure folgt vorteilhaft in einem Polylinker anschließend gegebenenfalls ein Terminator hinter dem Polylinker liegt. Diese Abfolge wiederholt sich mehrfach bevorzugt drei-, vier- oder fünfmal, so dass bis zu fünf Gene in einem Konstrukt zusammengeführt werden und so zur Expression in die transgene Pflanze eingebracht werden können. Vorteilhaft wiederholt sich die Abfolge bis zu dreimal oder falls erforderlich noch mehrmals. Die Nukleinsäuresequenzen werden zur Expression über die geeignete Schnittstelle beispielsweise im Polylinker hinter den Promotor inseriert. Vorteilhaft hat jede Nukleinsäuresequenz ihren eigenen Promotor und gegebenenfalls ihren eigenen Terminator. Derartige vorteilhafte Konstrukte werden beispielsweise in DE 10102337 oder DE 10102338 offenbart. Es ist aber auch möglich mehrere Nukleinsäuresequenzen hinter einem Promotor und ggf. vor einem Terminator zu inserieren. Dabei ist die Insertionsstelle bzw. die Abfolge der inserierten Nukleinsäuren in der Expressionskassette nicht von entscheidender Bedeutung, das heißt eine Nukleinsäuresequenz kann an erster oder letzter Stelle in der Kassette inseriert sein, ohne dass dadurch die Expression wesentlich beeinflusst wird. Es können in der Expressionskassette vorteilhaft unterschiedliche Promotoren wie beispielsweise der USP-, LegB4 oder DC3-Promotor und unterschiedliche Terminatoren verwendet werden. Es ist aber auch möglich nur einen Promotortyp in der Kassette zu verwenden. Dies kann jedoch zu unerwünschten Rekombinationsereignissen führen.

**[0095]** Wie oben beschrieben sollte die Transkription der eingebrachten Gene vorteilhaft durch geeignete Terminatoren am 3'-Ende der eingebrachten Biosynthesegene (hinter dem Stoppcodon) abgebrochen werden. Verwendet werden kann hier z.B. der OCS1 Terminator. Wie auch für die Promotoren, so sollten hier für jedes Gen unterschiedliche Terminatorsequenzen verwendet werden.

**[0096]** Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene umfassen, die in die Organismen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und vorteilhaft, in die Wirtspflanzen Regulationsgene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch ihre Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und darin zu exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Weiterhin können vorteilhaft im Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthalten sein oder aber diese Gene können auf einem weiteren oder mehreren weiteren Nukleinsäurekonstrukten liegen. Vorteilhaft werden als Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ein Gen ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) oder deren Kombinationen verwendet. Besonders vorteilhafte Nukleinsäuresequenzen sind Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe der Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase und/oder  $\Delta$ -9-Elongase.

**[0097]** Dabei können die vorgenannten Nukleinsäuren bzw. Gene in Kombination mit anderen Elongasen und Desaturasen in Expressionskassetten, wie den vorgenannten, kloniert werden und zur Transformation von Pflanzen Mithilfe von Agrobacterium eingesetzt werden.

**[0098]** 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. Die Expressionskassetten können prinzipiell direkt zum Einbringen in die Pflanze verwendet werden oder aber in einen Vektoren eingebracht werden.

**[0099]** Diese vorteilhaften Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, enthalten die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase codieren, oder ein Nukleinsäurekonstrukt, die die verwendete Nukleinsäure allein oder in Kombination mit weiteren Biosynthesegenen des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie den Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen,  $\Delta$ -4-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -9-Elongasen. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremo-

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

**[0100]** Die im Verfahren vorteilhaft verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren umfassen die unten beschriebenen Nukleinsäuren oder das oben beschriebene Genkonstrukt in einer Form, die sich zur Expression der verwendeten Nukleinsäuren in einer Wirtszelle eignen, was bedeutet, dass die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere Regulationssequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfasst. In einem rekombinanten Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", dass die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die Regulationssequenz(en) gebunden ist, dass die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist und sie aneinander gebunden sind, so dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen (z.B. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht wird). Der Begriff "Regulationssequenz" soll Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (z.B. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese Regulationssequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel: *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), oder siehe: Gruber und Crosby, in: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsgb.: Glick und Thompson, Kapitel 7, 89–108, einschließlich der Literaturstellen darin. Regulationssequenzen umfassen solche, welche die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, welche die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen unter bestimmten Bedingungen steuern. Der Fachmann weiß, dass die Gestaltung des Expressionsvektors von Faktoren, wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des gewünschten Proteins usw., abhängen kann.

**[0101]** Die verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen,  $\Delta$ -4-Desaturasen,  $\Delta$ -12-Desaturasen und/oder  $\omega$ -3-Desaturasen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen gestaltet sein. Dies ist vorteilhaft, da häufig Zwischenschritte der Vektorkonstruktion der Einfachheit halber in Mikroorganismen durchgeführt werden. Beispielsweise können die  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturase-Gene in bakteriellen Zellen, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanos, M.A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8:423–488; van den Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396–428: Academic Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J.F., et al., Hrsgb., S. 1–28, Cambridge University Press: Cambridge), Algen (Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology*, 1, 3:239–251), mit Vektoren nach einem Transformationsverfahren, wie beschrieben in WO 98/01572, sowie bevorzugt in Zellen vielzelliger Pflanzen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants" *Plant Cell Rep.*:583–586; *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, C Press, Boca Raton, Florida, Kapitel 6/7, S.71–119 (1993); F.F. White, B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128–43; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205–225 (und darin zitierte Literaturstellen)) exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden ferner erörtert in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, zum Beispiel unter Verwendung von T7-Promotor-Regulationssequenzen und T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert werden.

**[0102]** Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzier-

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

**[0103]** Beispiele für geeignete induzierbare nicht-Fusions-*E. coli*-Expressionsvektoren sind u.a. pTrc (Amann et al. (1988) *Gene* 69:301–315) und pET 11d (Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60–89). Die Zielgenexpression vom pTrc-Vektor beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET 11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten  $\lambda$ -Prophagen bereitgestellt, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.

**[0104]** Andere in prokaryotischen Organismen geeignete Vektoren sind dem Fachmann bekannt, diese Vektoren sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pACYC184, die pBR-Reihe, wie pBR322, die pUC-Reihe, wie pUC18 oder pUC19, die M113mp-Reihe, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1, *lgt11* or pBdCl, in *Streptomyces* pIJ141, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667.

**[0105]** Bei einer weiteren Ausführungsform ist der Expressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYeDesaturase1 (Baldari et al. (1987) *Embo J.* 6:229–234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) *Cell* 30:933–943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113–123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie den filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of fungi*, J.F. Peberdy et al., Hrsgb., S. 1–28, Cambridge University Press: Cambridge, oder in: *More Gene Manipulations in Fungi* [J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396–428: Academic Press: San Diego]. Weitere geeignete Hefevektoren sind beispielsweise pAG-1, YE<sub>p6</sub>, YE<sub>p13</sub> oder pEMBLE<sub>23</sub>.

**[0106]** Alternativ kann die  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (z.B. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156–2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) *Virology* 170:31–39).

**[0107]** Die oben genannten Vektoren bieten nur einen kleinen Überblick über mögliche geeignete Vektoren. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und sind zum Beispiel beschrieben in: *Cloning Vectors* (Hrsgb. Pouwels, P.H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen siehe in den Kapiteln 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

**[0108]** Letztendlich werden die  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturase-Gene in Pflanzenzellen oder ganzen Pflanzen (z.B. Spermatophyten, wie Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20:1195–1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", *Nucl. Acids Res.* 12:8711–8721; *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*, in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15–38.

**[0109]** Eine Pflanzen-Expressions-kassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzenzellen steuern können und funktionsfähig verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription, erfüllen kann, beispielsweise Polyadenylierungssignale. Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus *Agrobacterium tumefaciens*-T-DNA stammen, wie das als Octopinsynthese bekannte Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., *EMBO J.* 3 (1984) 835ff.) oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch alle anderen in Pflanzen funktionell aktiven Terminatoren sind ge-

eignet.

**[0110]** Da die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebenen beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressionskassette vorzugsweise andere funktionsfähig verbundenen Sequenzen, wie Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaikvirus, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht, enthält (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693–8711).

**[0111]** Die Pflanzengenexpression muss wie oben beschrieben funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise durchführt. Nutzbare Promotoren sind konstitutive Promotoren (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195–2202), wie diejenigen, die von Pflanzenviren stammen, wie 35S CAMV (Franck et al., Cell 21 (1980) 285–294), 19S CaMV (siehe auch US 5352605 und WO 84/02913) oder Pflanzenpromotoren, wie der in US 4,962,028 beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.

**[0112]** Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktionsfähigen Verbindung in Pflanzengenexpressions-Kassetten sind Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des Genproduktes in sein entsprechendes Zellkompartiment notwendig sind (siehe eine Übersicht in Kermodé, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285–423 und darin zitierte Literaturstellen), beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen.

**[0113]** Die Pflanzengenexpression lässt sich auch wie oben beschrieben über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89–108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397–404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

**[0114]** Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind geeignete Promotoren, beispielsweise der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361–366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alpha-Amylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091).

**[0115]** Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Fettsäure-, Lipid- und Ölbiosynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos. Geeignete Promotoren sind der Napingen-Promotor aus Raps (US 5,608,152), der USP-Promotor aus *Vicia faba* (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459–67), der Oleosin-Promotor aus *Arabidopsis* (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus *Phaseolus vulgaris* (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus *Brassica* (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promotor (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233–9) sowie Promotoren, welche die samenspezifische Expression in Monokotyledonen-Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der lpt2- oder lpt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen (Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen).

**[0116]** Insbesondere kann die multiparallele Expression der im Verfahren verwendeten  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase gewünscht sein. Die Einführung solcher Expressionskassetten kann über eine simultane Transformation mehrerer einzelner Expressionskonstrukte erfolgen oder bevorzugt durch Kombination mehrerer Expressionskassetten auf einem Konstrukt. Auch können mehrere Vektoren mit jeweils mehreren Expressionskassetten transformiert und auf die Wirtszelle übertragen werden.

**[0117]** Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die plastidenspezifische Expression herbeiführen, da Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer sowie einige Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden. Geeignete Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor, sind beschrieben in WO 95/16783 und WO 97/06250, und der clpP-Promotor aus *Arabidopsis*, beschrieben in WO

99/46394.

**[0118]** Vektor-DNA lässt sich in prokaryotische oder eukaryotische Zellen über herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie hier verwendet, sollen eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure (z.B. DNA) in eine Wirtszelle, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Copräzipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofektion, natürliche Kompetenz, chemisch vermittelter Transfer, Elektroporation oder Teilchenbeschuss, umfassen. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, lassen sich finden in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, old Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern, wie Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium protocols, Hrsgb: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

**[0119]** Wirtszellen, die im Prinzip zum Aufnehmen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des erfindungsgemäßen Genproduktes oder des erfindungsgemäßen Vektors geeignet sind, sind alle prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Die vorteilhafterweise als Zwischenwirte verwendeten Wirtsorganismen sind Mikroorganismen, wie Pilze oder Hefen. Bevorzugt werden im erfindungsgemäßen Verfahren Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Nachtkerze, Hanf, Diestel, Erdnuss, Canola, Lein, Soja, Saflor, Sonnenblume, Borretsch, oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniak, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölplume, Kokosnuss) und Futterfeldfrüchte verwendet. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Soja, Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Nachtkerze, Sonnenblume, Saflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss).

**[0120]** Weitere Erfindungsgegenstände sind die im folgenden aufgezählten Nukleinsäuresequenzen, die für  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen und/oder  $\Delta$ -12-Desaturasen codieren.

**[0121]** Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Sequenz codieren, oder
- c) Derivate die in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 70 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2 codieren und eine  $\Delta$ -6-Desaturaseaktivität aufweisen.

**[0122]** Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 7 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 8 dargestellten Sequenz codieren, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 7 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 70 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 8 codieren und eine  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität aufweisen.

**[0123]** Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 9 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 10 dargestellten Sequenz codieren, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 9 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 10 codieren und eine  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität aufweisen.

**[0124]** Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 23 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 24 dargestellten Sequenz codieren, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 23 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens



40 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 24 codieren und eine  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität aufweisen.

**[0125]** Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 25 dargestellten Sequenz, oder
- b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 26 dargestellten Sequenz codieren, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 25 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 26 codieren und eine  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität aufweisen.

**[0126]** Die oben genannte erfindungsgemäßen Nukleinsäuren stammen von Organismen, wie Pilzen, Pflanzen wie Algen oder Diatomeen, die PUFAs synthetisieren können.

**[0127]** Vorteilhaft stammen die isolierten oben genannten Nukleinsäuresequenzen aus der Diatomeengattung *Thalassiosira* oder aus der Familie der *Prasinophyceae* wie der Gattung *Ostreococcus*, aus der Klasse der *Euglenophyceae* wie der Gattung *Euglenia* oder *Pythiaceae* wie der Gattung *Phytophthora* stammt.

**[0128]** Besonders bevorzugte Nukleinsäuresequenzen stammen aus der Gattung und Art *Phytophthora sojae*. Diese Nukleinsäuresequenzen ermöglichen in einer vorteilhaften Ausführungsform die Synthese von EPA und/oder ARA. Die folgende Tabelle gibt derartige vorteilhafte Nukleinsäuresequenzen wieder.

Gen	Enzymfunktion	Proteinsequenz	SEQ ID
D6-Des(Ps)	$\Delta$ 6-Desaturase	456 As	SEQ ID NO: 1
D6-Elo(Ps)	$\Delta$ 6-Elongase	304 As	SEQ ID NO: 3
D6-Elo(Ps)_2	$\Delta$ 6-Elongase	278 As	SEQ ID NO: 5
D6-Elo(Ps)_3	$\Delta$ 6-Elongase	278 As	SEQ ID NO: 7
D5-Des(Ps)	$\Delta$ 5-Desaturase	498 As	SEQ ID NO: 9
D12-Des(Ps)	$\Delta$ 12-Desaturase	398 As	SEQ ID NO: 25
O3-Des(Ps)	$\omega$ 3-Desaturase	363 As	SEQ ID NO: 23

**[0129]** Zu den erfindungsgemäßen Gegenständen gehören außerdem, wie oben beschrieben, isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase- und  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität codieren, wobei die durch diese Nukleinsäuresequenzen codierten  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen und/oder  $\Delta$ -12-Desaturasen  $C_{18}$ - oder  $C_{20}$ -Fettsäuren mit ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen wie  $C_{18}:1^{\Delta 9}$ ,  $C_{18}:2^{\Delta 9,12}$  oder  $C_{18}:3^{\Delta 9,12,15}$  mehrfach ungesättigte  $C_{20}$ -Fettsäuren mit drei oder vier Doppelbindungen wie  $C_{20}:3^{\Delta 8,11,14}$  oder  $C_{20}:4^{\Delta 8,11,14,17}$  umsetzen. Vorteilhaft werden die Fettsäuren in den Phospholipiden oder CoA-Fettsäureestern desaturiert, vorteilhaft in den CoA-Fettsäureester.

**[0130]** Der Begriff "Nukleinsäure(molekül)", wie hier verwendet, umfasst in einer vorteilhaften Ausführungsform zudem die am 3'- und am 5'-Ende des kodierenden Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens 500, bevorzugt 200, besonders bevorzugt 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des kodierenden Bereichs und mindestens 100, bevorzugt 50, besonders bevorzugt 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des kodierenden Genbereichs. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure vorliegen. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vorzugsweise keine Sequenzen, welche die Nukleinsäure in der genomischen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (z.B. Sequenzen, die sich an den 5'- und 3'-Enden der Nukleinsäure befinden). Bei verschiedenen Ausführungsformen kann das isolierte  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase- und  $\Delta$ -12-Desaturasemolekül zum Beispiel weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb an Nukleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt flankieren.

**[0131]** Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuremoleküle, z.B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleo-

tidsequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 oder eines Teils davon, kann unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Auch kann Mithilfe von Vergleichsalgorithmen beispielsweise eine homologe Sequenz oder homologe, konservierte Sequenzbereiche auf DNA oder Aminosäureebene identifiziert werden. Diese können als Hybridisierungssonde sowie Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) zur Isolierung weiterer im Verfahren nützlicher Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz oder von Teilen davon, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die vollständigen Sequenz oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz erstellt worden sind). Zum Beispiel lässt sich mRNA aus Zellen isolieren (z.B. durch das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* 18:5294–5299) und cDNA mittels Reverser Transkriptase (z.B. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL) herstellen. Synthetische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion fassen sich auf der Basis einer der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 gezeigten Sequenzen oder Mithilfe der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 dargestellten Aminosäuresequenzen erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ von genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer Desaturase-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, beispielsweise mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

**[0132]** Homologe der verwendeten  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturase-Nukleinsäuresequenzen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 bedeutet beispielsweise allelische Varianten mit mindestens etwa 40 oder 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 oder 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 oder 80 %, 90 % oder 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Identität bzw. Homologie zu einer in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 gezeigten Nukleotidsequenzen oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga oder Teilen davon. Weiterhin sind isolierte Nukleinsäuremoleküle einer Nukleotidsequenz, die an eine der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 gezeigten Nukleotidsequenzen oder einen Teil davon hybridisieren, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Unter einem Teil gemäß der Erfindung ist dabei zu verstehen, dass mindestens 25 Basenpaare (= bp), 50 bp, 75 bp, 100 bp, 125 bp oder 150 bp, bevorzugt mindestens 175 bp, 200 bp, 225 bp, 250 bp, 275 bp oder 300 bp, besonders bevorzugt 350 bp, 400 bp, 450 bp, 500 bp oder mehr Basenpaare für die Hybridisierung verwendet werden. Es kann auch vorteilhaft die Gesamtsequenz verwendet werden. Allelische Varianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus/in der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 dargestellten Sequenz erhalten lassen, wobei aber die Absicht ist, dass die Enzymaktivität der davon herrührenden synthetisierten Proteine für die Insertion eines oder mehrerer Gene vorteilhafterweise beibehalten wird. Proteine, die noch die enzymatische Aktivität der  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase besitzen, das heißt deren Aktivität im wesentlichen nicht reduziert ist, bedeutet Proteine mit mindestens 10 %, vorzugsweise 20 %, besonders bevorzugt 30 %, ganz besonders bevorzugt 40 % der ursprünglichen Enzymaktivität, verglichen mit dem durch SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ

ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 kodierten Protein. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für das Vergleichen verschiedener Sequenzen stehen dem Fachmann eine Reihe von Programmen, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen zur Verfügung. Dabei liefern die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351–360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151–153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443–453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482–489 (1981))], die im GCG Software-Paket [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Die falls nicht anders angegeben als Standardeinstellungen immer für Sequenzvergleiche verwendet wurden.

**[0133]** Homologen der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 bedeuten beispielsweise auch bakterielle, Pilz- und Pflanzenhomologen, verkürzte Sequenzen, einzelsträngige DNA oder RNA der kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Sequenz.

**[0134]** Homologen der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 bedeutet auch Derivate, wie beispielsweise Promotorvarianten. Die Promotoren stromaufwärts der angegebenen Nukleotidsequenzen können durch einen oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) modifiziert werden, ohne dass jedoch die Funktionalität oder Aktivität der Promotoren gestört wird. Es ist weiterhin möglich, dass die Aktivität der Promotoren durch Modifikation ihrer Sequenz erhöht ist oder dass sie vollständig durch aktivere Promotoren, sogar aus heterologen Organismen, ersetzt werden.

**[0135]** Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat sowie die Addition oder Modifikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Membranen verwendet werden, umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase. Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle zusammen Acetoacetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so dass ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (bezüglich der Fettsäuresynthese in Mikroorganismen siehe F.C. Neidhardt et al. (1996) E. coli und Salmonella. ASM Press: Washington, D.C., S. 612–636 und darin enthaltene Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsgb.) (1999) Biology of Prokaryotes. Thieme: Stuttgart, New York, und die enthaltene Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993) Microbiological Reviews 57:522–542 und die enthaltene Literaturstellen). Die so hergestellten an Phospholipide gebundenen Fettsäuren müssen anschließend wieder für die weiteren Elongationen aus den Phospholipiden in den FettsäureCoA-Ester-Pool überführt werden. Dies ermöglichen Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen. Weiterhin können diese Enzyme die elongierten Fettsäuren wieder von den CoA-Estern auf die Phospholipide übertragen. Diese Reaktionsabfolge kann gegebenenfalls mehrfach durchlaufen werden.

**[0136]** Vorläufer für die PUFA-Biosynthese sind beispielsweise Ölsäure, Linol- und Linolensäure. Diese C<sub>18</sub>-Kohlenstoff-Fettsäuren müssen auf C<sub>20</sub> und C<sub>22</sub> verlängert werden, damit Fettsäuren vom Eicosa- und Docosa-Kettentyp erhalten werden. Mithilfe der im Verfahren verwendeten Desaturasen und/oder Elongasen können Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure vorteilhaft Eicosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure hergestellt werden und anschließend für verschiedene Zwecke bei Nahrungsmittel-, Futter-, Kosmetik- oder pharmazeutischen Anwendungen verwendet werden. Mit den genannten Enzymen können C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft mindestens vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit vorteilhaft fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül hergestellt werden. Substrate der verwendeten Desaturasen und Elongasen im erfindungsgemäßen Verfahren sind C<sub>16</sub>-, C<sub>18</sub>- oder C<sub>20</sub>-Fettsäuren wie zum Beispiel Linolensäure,  $\gamma$ -Linolensäure,  $\alpha$ -Linolensäure, Dihomo- $\gamma$ -linolensäure, Eicosatetraensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte Substrate sind Linolensäure,  $\gamma$ -Linolensäure und/oder  $\alpha$ -Linolensäure, Dihomo- $\gamma$ -linolensäure bzw. Arachidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Die synthetisierten C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindes-

tens vier, fünf oder sechs Doppelbindungen in der Fettsäure fallen im erfindungsgemäßen Verfahren in Form der freien Fettsäure oder in Form ihrer Ester beispielsweise in Form ihrer Glyceride vorteilhaft ihrer Triglyceride an.

**[0137]** Unter dem Begriff "Glycerid" wird ein mit ein, zwei oder drei Carbonsäureresten verestertes Glycerin verstanden (Mono-, Di- oder Triglycerid). Unter "Glycerid" wird auch ein Gemisch an verschiedenen Glyceriden verstanden. Das Glycerid oder das Glyceridgemisch kann weitere Zusätze, z.B. freie Fettsäuren, Antioxidantien, Proteine, Kohlenhydrate, Vitamine und/oder andere Substanzen enthalten.

**[0138]** Unter einem "Glycerid" im Sinne des erfindungsgemäßen Verfahrens werden ferner vom Glycerin abgeleitete Derivate verstanden. Dazu zählen neben den oben beschriebenen Fettsäureglyceriden auch Glycerophospholipide und Glyceroglycolipide. Bevorzugt seien hier die Glycerophospholipide wie Lecithin (Phosphatidylcholin), Cardiolipin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylserin und Alkylacylglycerophospholipide beispielhaft genannt.

**[0139]** Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationsorte transportiert und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen, 1998, Lipid, 100(4-5):161-166).

**[0140]** Veröffentlichungen über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese, Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Betaoxidation, Fettsäuremodifikation und Cofaktoren, Triacylglycerin-Speicherung und -Assemblierung einschließlich der Literaturstellen darin siehe in den folgenden Artikeln: Kinney, 1997, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge und Browse, 1995, Plant Cell 7:957-970; Shanklin und Cahoon, 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:611-641; Voecker, 1996, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, Prog. Lipid R. 31:397-417; Gühnmann-Schäfer & Kindl, 1995, Biochim. Biophys Acta 1256:181-186; Kunau et al., 1995, Prog. Lipid Res. 34:267-342; Stymne et al., 1993, in: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants, Hrsgb.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal. 13(1):1-16.

**[0141]** Die im Verfahren hergestellten PUFAs, umfassen eine Gruppe von Molekülen, die höhere Tiere nicht mehr synthetisieren können und somit aufnehmen müssen oder die höhere Tiere nicht mehr ausreichend selbst herstellen können und somit zusätzlich aufnehmen müssen, obwohl sie leicht von anderen Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden, beispielsweise können Katzen Arachidonsäure nicht mehr synthetisieren.

**[0142]** Unter Phospholipiden im Sinne der Erfindung sind zu verstehen Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin und/oder Phosphatidylinositol vorteilhafterweise Phosphatidylcholin. Die Begriffe Produktion oder Produktivität sind im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Produktivität innerhalb einer Pflanzenzelle oder einer Pflanze, das heißt den Gehalt an den gewünschten im Verfahren hergestellten Fettsäuren bezogen auf den Gehalt an allen Fettsäuren in dieser Zelle oder Pflanze. Die Begriffe Biosynthese oder Biosyntheseweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle aus Zwischenverbindungen, beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Die Begriffe Abbau oder Abbauweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger komplexe Moleküle) beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess. Der Begriff Stoffwechsel ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Stoffwechsel einer bestimmten Verbindung (z.B. der Stoffwechsel einer Fettsäure) umfasst dann die Gesamtheit der Biosynthese-, Modifikations- und Abbauwege dieser Verbindung in der Zelle, die diese Verbindung betreffen.

**[0143]** Bei einer weiteren Ausführungsform kodieren Derivate des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls wieder gegeben in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 Proteine mit mindestens 40 %, vorteilhaft etwa 50 oder 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 oder 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 oder 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie ( Homologie im Sinne der Erfindung soll Identität bedeuten) zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5

1989: 151–153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443–453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482–489 (1981)), die im GCG Software-Paket [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm BestFit über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Die falls nicht anders angegeben als Standardeinstellungen immer für Sequenzvergleiche verwendet wurden.

**[0144]** Die Erfindung umfasst zudem Nukleinsäuremoleküle, die sich von einer der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 gezeigten Nukleotidsequenzen (und Teilen davon) aufgrund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden und somit die gleiche  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase- oder  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität codieren wie diejenige, die von den in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 gezeigten Nukleotidsequenzen kodiert wird.

**[0145]** Zusätzlich zu den in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 gezeigten  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen oder  $\Delta$ -12-Desaturasen erkennt der Fachmann, dass DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen in den Aminosäuresequenzen der  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen und/oder  $\Delta$ -12-Desaturasen führen, innerhalb einer Population existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -12-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  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -12-Desaturase-Gens. Sämtliche und alle dieser Nukleotidvariationen und daraus resultierende Aminosäurepolymorphismen in der  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase und/oder  $\Delta$ -12-Desaturase, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die funktionelle Aktivität von nicht verändern, sollen im Umfang der Erfindung enthalten sein.

**[0146]** Für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhafte Nukleinsäuremoleküle können auf der Grundlage ihrer Homologie zu den hier offenbarten  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturase-Nukleinsäuren unter Verwendung der Sequenzen oder eines Teils davon als Hybridisierungs-sonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. Dabei können beispielsweise isolierte Nukleinsäuremoleküle verwendet werden, die mindestens 15 Nukleotide lang sind und unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekülen, die eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 umfassen, hybridisieren. Es können auch Nukleinsäuren mindestens 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide verwendet werden. Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie hier verwendet, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen, die mindestens 60 % homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, dass Sequenzen, die mindestens etwa 65 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75 % oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1–6.3.6., finden. Ein bevorzugtes, nicht einschränkendes Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in  $6 \times$  Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/sodium citrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in  $0,2 \times$  SSC, 0,1 % SOS bei 50 bis 65°C. Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Hybridisierungsbedingungen sich je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn beispielsweise organische Lösungsmittel vorliegen, hinsichtlich der Temperatur und der Konzentration des Puffers unterscheiden. Die Temperatur unterscheidet sich beispielsweise unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" je nach dem Typ der Nukleinsäure zwischen 42°C und 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von  $0,1$  bis  $5 \times$  SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel im obengenannten Puffer vorliegt, zum Beispiel 50 % Formamid, ist die Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride zum Beispiel  $0,1 \times$  SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise zwischen 30°C und 45°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA-Hybride zum Beispiel  $0,1 \times$  SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die vorstehend genannten Hybridisierungstemperaturen sind beispielsweise für eine Nukleinsäure mit etwa 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid bestimmt. Der Fachmann weiß, wie die erforderlichen Hybridisierungsbedingungen anhand von Lehrbüchern, wie dem vorstehend erwähnten oder aus

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

**[0147]** Zur Bestimmung der prozentualen Homologie (= Identität) von zwei Aminosäuresequenzen (z.B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26) oder von zwei Nukleinsäuren (z.B. SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25) werden die Sequenzen zum Zweck des optimalen Vergleichs untereinander geschrieben (z.B. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nukleinsäure eingefügt werden, um ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure zu erzeugen). Die Aminosäurereste oder Nukleotide an den entsprechenden Aminosäurepositionen oder Nukleotidpositionen werden dann verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz durch den gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nukleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz belegt wird, dann sind die Moleküle an dieser Position homolog (d.h. Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Homologie", wie hier verwendet, entspricht Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl an identischen Positionen, die den Sequenzen gemeinsam sind (d.h. % Homologie = Anzahl der identischen Positionen/Gesamtanzahl der Positionen × 100). Die Begriffe Homologie und Identität sind damit als Synonym anzusehen. Die verwendeten Programme bzw. Algorithmen sind oben beschrieben.

**[0148]** Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das für eine  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase kodiert, die zu einer Proteinsequenz der SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 oder SEQ ID NO: 26 homolog ist, kann durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 erzeugt werden, so dass eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das kodierte Protein eingebracht werden. Mutationen können in eine der Sequenzen der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 durch Standardtechniken, wie stellenspezifische Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäureresten hergestellt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest gegen einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seitenketten, (z.B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einer  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase oder  $\omega$ -3-Desaturase wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. Alternativ können bei einer anderen Ausführungsform die Mutationen zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -12-Desaturase oder  $\omega$ -3-Desaturase kodierenden Sequenz eingebracht werden, z.B. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können nach der hier beschriebenen  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturase-Aktivität durchmustert werden, um Mutanten zu identifizieren, die die  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturase-Aktivität beibehalten haben. Nach der Mutagenese einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 kann das kodierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann z.B. unter Verwendung der hier beschriebenen Tests bestimmt werden.

**[0149]** Weitere Erfindungsgegenstände sind ein transgener nicht-humaner Organismus vorteilhaft eine trans-

gene Pflanze, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25 enthalten oder ein Genkonstrukt oder einen Vektor, die diese erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthaften.

**[0150]** Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefasst werden sollten.

#### Beispiele

##### Beispiel 1: Allgemeine Klonierungsverfahren:

**[0151]** 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.

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

**[0152]** 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. Sci. 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 und Elongasen aus *Phytophthora sojae*

**[0153]** Für die Suche nach neuen Genen mit  $\Delta$ -6-,  $\Delta$ -5-,  $\Delta$ -12-,  $\omega$ 3-Desaturase and  $\Delta$ -6-Elongase Aktivität wurde eine genomische Datenbank von *Phytophthora sojae* durchsucht (<http://genome.jgi-psf.org/sojae/sojae1.home.html>). Diese Datenbank enthält Rohsequenzen, die etwa 90% der genomischen DNA des Organismus abdecken. Für alle gesuchten Aktivitäten konnten putative Kandidatengene gefunden werden. Durch Herstellung und Charakterisierung von cDNA dieser Kandidatengene konnte deren korrekte kodierende offene Leseraster gefunden und die Aminosäuresequenz abgeleitet werden. Diese ist wie folgt:

Gen	Enzymfunktion	Proteinsequenz	SEQ ID
D6-Des(Ps)	$\Delta$ 6-Desaturase	456 As	SEQ ID NO: 1
D6-Elo(Ps)	$\Delta$ 6-Elongase	304 As	SEQ ID NO: 3
D6-Elo(Ps)_2	$\Delta$ 6-Elongase	278 As	SEQ ID NO: 5
D6-Elo(Ps)_3	$\Delta$ 6-Elongase	278 As	SEQ ID NO: 7
D5-Des(Ps)	$\Delta$ 5-Desaturase	498 As	SEQ ID NO: 9
D12-Des(Ps)	$\Delta$ 12-Desaturase	398 As	SEQ ID NO: 25
O3-Des(Ps)	$\omega$ 3-Desaturase	363 As	SEQ ID NO: 23

**[0154]** Zur Herstellung von cDNA wurde Gesamt-RNA von *Phytophthora sojae* mit Hilfe des RNAeasy Kits der Firma Qiagen (Valencia, CA, US) isoliert. Aus der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von oligo-dT-Cellulose poly-A+ RNA (mRNA) isoliert (Sambrook et al., 1989). Die RNA wurde mit dem Reverse Transcription System Kit von Promega revers transkribiert und die synthetisierte cDNA in den lambda ZAP Vektor (lambda ZAP Gold, Stratagene) kloniert. Entsprechend der Herstellerangaben wurde die cDNA zur Plasmid-DNA entpackt. Die Plasmid-Bank wurde dann nach den entsprechenden putativen Kandidatengenen gesichtet (Hybridisierung von Bakterien-Klonen, Sambrook et al. 1989) und positive Klone wurden sequenziert. Die entsprechenden cDNA-Klone wurde dann für die PCR zur Klonierung von Expressionsplasmiden verwendet.

##### Beispiel 4: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression von *Phytophthora sojae* Genen in Hefen

**[0155]** Zur heterologen Expression in Hefen werden über PCR mit entsprechenden spezifischen Primern die entsprechenden Sequenzen amplifiziert und in den Hefe-Expressionsvektor pYES2.1-TOPO (Invitrogen) ge-

mäss Herstellerangaben kloniert. Dabei werden ausschließlich die für die PUFA-Proteine kodierende offenen Leserrahmen der Gene amplifiziert. Zusätzlich wird am 5' eine Kozak-Sequenz (Cell 1986, 44:283–292) angehängt:

Gen	Basen-paare	Primer	SEQ ID
D5-Des(Ps)	1497 bp	Fwd : gccatggccccatcgagaccgac Rvs : ttagcccatgtggacggaca	SEQ ID NO: 27 SEQ ID NO: 28
D6-Des(Ps)	1371 bp	Fwd : accatggtggatggcccaagacca Rvs : ttacatggccgggaactcgagcagg	SEQ ID NO: 29 SEQ ID NO: 30
D12-Des(Ps)	1197 bp	Fwd : gccatggcgtcctgaaccgg Rvs : tagagctgttctttaga	SEQ ID NO: 31 SEQ ID NO: 32
O3-Des(Ps)	1092 bp	Fwd: gccatggcgtccaagcaggagca Rvs: tcagtggccttagtcttggtcgcc	SEQ ID NO: 33 SEQ ID NO: 34
D6-Elo(Ps)	915 bp	Fwd: aagatggagacgacctcgcgcg Rvs: ttactgctctcttggcgaccgcagcg	SEQ ID NO: 35 SEQ ID NO: 36
D6-Elo(Ps)_2	837 bp	Fwd: gccatggcgtcggagctgctgca Rvs: ttagaggttcttggccgg	SEQ ID NO: 37 SEQ ID NO: 38
D6-Elo(Ps)_3	837 bp	Fwd: accatgctggccgacctgctgc Rvs: ttagagcttcttggc	SEQ ID NO: 39 SEQ ID NO: 40

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA  
 5,00 µL 10 × Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>  
 5,00 µL 2mM dNTP  
 1,25 µL je Primer (10 pmol/µL des 5'-ATG sowie des 3'-Stopp Primers)  
 0,50 µL Advantage-Polymerase

**[0156]** Die Advantage-Polymerase von Clontech wird eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

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

**[0157]** Die PCR Produkte werden gemäss Herstellerangaben mit dem Plasmid pYES2.1-TOPO (Invitrogen) inkubiert. Die Inkubationsreaktionen werden dann in *E. coli* DH5α-Zellen (Invitrogen) nach Herstellerangaben transformiert. Positive Klone werden durch PCR (siehe Reaktion oben) identifiziert und die Plasmid-DNA isoliert (Qiagen Dneasy). Die entstandene Plasmide werden durch Sequenzierung überprüft und in den *Saccharomyces* Stamm INVSc1 (Invitrogen) durch Elektroporation (1500 V) transformiert. Zur Kontrolle wird pYES2.1 (Leervektor) parallel transformiert. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgt auf Komplet-Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil. Nach der Selektion werden je drei Transformanten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

**[0158]** Für die Expression der Gene aus *Phytophthora sojae* werden zunächst Vorkulturen aus jeweils 5 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose aber ohne Uracil mit den ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei 30°C, 200 rpm inkubiert. 5 ml CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil) mit 2% Raffinose und 300 µM verschiedener Fettsäuren werden dann mit den Vorkulturmen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Die Expression wird durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen werden für weitere 96 h bei 20°C inkubiert.



Beispiel 5: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

**[0159]** Für die Transformation von Pflanzen werden weitere Transformationsvektoren auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu werden mit folgenden Primerpaaren NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenz eingefügt (siehe folgende Tabelle).

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA  
5,00 µL 10 × Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00 µL 2mM dNTP  
1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)  
0,50 µL Advantage-Polymerase

**[0160]** Die Advantage-Polymerase von Clontech wird eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

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

Gen	Basen- paare	Primer	SEQ ID
D5-Des(Ps)	1497 bp	Fwd : gcggccgcgccatggcccccacgagaccgac Rvs : gcggccgcttagcccaatgtggacggaca	SEQ ID NO: 41  SEQ ID NO: 42
D6-Des(Ps)	1371 bp	Fwd : gcggccgcacccatggtggatggccccaagacca Rvs : gcggccgcttacatggccgggaactcgagcagg	SEQ ID NO: 43  SEQ ID NO: 44
D12-Des(Ps)	1197 bp	Fwd : gcggccgcgccatggcgatcctgaacccgg Rvs : gcggccgctagagctgttctttaga	SEQ ID NO: 45  SEQ ID NO: 46
O3-Des(Ps)	1092 bp	Fwd: gcggccgcgccatggcgtccaagcaggagca Rvs: gcggccgctcagttggccttagtcttggtcgcc	SEQ ID NO: 47  SEQ ID NO: 48
D6-Elo(Ps)	915 bp	Fwd: gcggccgcaagatggagacgaccttcgcgcg Rvs: gcggccgcttactcgtcttcttggcgaccgagcg	SEQ ID NO: 49  SEQ ID NO: 50
D6-Elo(Ps)_2	837 bp	Fwd: gcggccgcgccatggcgtcggagctgctgca Rvs: gcggccgcttagaggttcttcttggccgg	SEQ ID NO: 51  SEQ ID NO: 52
D6-Elo(Ps)_3	837 bp	Fwd: gcggccgcacccatgtcggccgacctgctgc Rvs: gcggccgcttagagcttcttcttggc	SEQ ID NO: 53  SEQ ID NO: 54

**[0161]** Die PCR Produkte werden für 4 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wird in gleicherweise inkubiert. Anschließend werden die PCR Produkte sowie der 7624 bp große Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgt mittels Qiagen Gel purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend werden Vektor und PCR-Produkte ligiert.

**[0162]** Dazu wird das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandene Plasmide werden durch Sequenzierung verifiziert.

**[0163]** pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P, Svab, Z, Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25:989–994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des OCS-Gens aus dem A. tumefaciens Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve,H., Dhaese,P., Seurinck,J., Lemmers,M., Van Montagu,M. and Schell,J. Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1(6), 499–511 (1982). Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1 bis 684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Pro-

motor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz: 5'-GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCCGGATCTGCTGGCTATGAA-3') [SEQ ID NO: 55].

**[0164]** Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP, das für die Pflanzen-Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt werden kann.

#### Beispiel 6: Expression von *Phytophthora sojae* Genen in Hefen

**[0165]** Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit dem Plasmid pYES2.1 oder den Plasmiden pYES-d4Des(Ps), pYES-dSDes(Ps), pYES-d6Des(Ps), pYES-d12Des(Ps), pYES-o3Des(Ps), pYES-d6Elo(Ps), pYES-d6Elo-2(Ps) und pYES-d6Elo-3(Ps) transformiert wurden, werden folgendermaßen analysiert: Die Hefezellen aus den Hauptkulturen werden durch Zentrifugation (100 × g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten werden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu werden 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 erfolgt durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren werden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend werden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben werden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse sind 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 erfolgt 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):1581–585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293–298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215–218.

#### Beispiel 7: Funktionelle Charakterisierung von Genen aus *Phytophthora sojae*:

**[0166]** Die Aktivität und Substratspezifität der einzelnen Gene kann nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden. Die gefütterten Substrate liegen in großen Mengen in allen transgenen Hefen vor, wodurch die Aufnahme dieser Fettsäuren in die Hefen bewiesen ist. Die transgenen Hefen zeigen die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der Gene. Dies bedeutet, dass die Gene aus *Phytophthora sojae* funktional exprimiert werden können.

**[0167]** Die Substratspezifität von Desaturasen und Elongasen kann nach Expression in Hefe durch die Fütterung mittels verschiedener Hefen ermittelt werden. Beschreibungen für die Bestimmung der einzelnen Aktivitäten finden sich in WO 93/11245 für o3-Desaturasen, WO 94/11516 für Δ12-Desaturasen, WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393, WO 96/21022, WO0021557 und WO 99/27111 für Δ6-Desaturasen, Qiu et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 276, 31561–31566 für Δ4-Desaturasen, Hong et al. 2002, *Lipids* 37,863–868 für Δ5-Desaturasen, für Elongasen in Zank, T.K. et al. *Plant Journal* 31:255–268, 2002.

**[0168]** Die Aktivität der einzelnen Desaturasen und Elongasen wird aus der Konversionsrate errechnet nach der Formel [Substrat/(Substrat + Produkt)·100].

#### Beispiel 8: Erzeugung von transgenen Pflanzen

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

**[0169]** Zur Erzeugung transgener Rapspflanzen werden binäre Vektoren wie die unter Beispiel 5 erzeugten pSUN Plasmide mit Genen aus *Phytophthora sojae* in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260 transformiert (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 cm<sup>2</sup>) 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 mikroM 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.

**[0170]** 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

**[0171]** 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 Samen:

**[0172]** 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-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. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1–27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

**[0173]** Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935–12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141–145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide – Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952)–16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

**[0174]** Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen.

**[0175]** Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103–129; 131–163 und 165–192 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

**[0176]** Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromata-

graphie).

**[0177]** Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-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).

**[0178]** 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.

**[0179]** Pflanzenmaterial wird zunächst mechanisch durch Mörsern homogenisiert, um es einer Extraktion zugänglicher zu machen.

**[0180]** 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.

Äquivalente:

**[0181]** Der Fachmann erkennt oder kann viele Äquivalente der hier beschriebenen erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen feststellen, indem er lediglich Routineexperimente verwendet. Diese Äquivalente sollen von den Patentansprüchen umfasst sein.

**Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.**

**Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.**

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen in transgenen Pflanzen mit einem Gehalt von mindestens 15 Gew.-% bezogen auf den Gesamttriglyceridgehalt der transgenen Pflanze, **dadurch gekennzeichnet**, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:

- a) Einbringen eines Nukleinsäurekonstrukts in die transgene Pflanze, das Nukleinsäuresequenzen enthält, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase, eine  $\Delta$ -6-Elongase und eine  $\Delta$ -5-Desaturase codiert, oder
- b) Einbringen eines Nukleinsäurekonstrukts in die transgene Pflanze, das Nukleinsäuresequenzen enthält, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase, eine  $\Delta$ -6-Elongase, eine  $\Delta$ -5-Desaturase, eine  $\Delta$ -12-Desaturase und  $\omega$ -3-Desaturase codiert, oder
- c) Einbringen eines Nukleinsäurekonstrukts in die transgene Pflanze, das Nukleinsäuresequenzen enthält, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase, eine  $\Delta$ -6-Elongase, eine  $\Delta$ -5-Desaturase, eine  $\Delta$ -5-Elongase und  $\Delta$ -4-Desaturase codiert, oder
- d) Einbringen eines Nukleinsäurekonstrukts in die transgene Pflanze, das Nukleinsäuresequenzen enthält, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase, eine  $\Delta$ -6-Elongase, eine  $\Delta$ -5-Desaturase, eine  $\Delta$ -5-Elongase, eine  $\Delta$ -4-Desaturase, eine  $\Delta$ -12-Desaturase und eine  $\omega$ -3-Desaturase codiert, und

e) Gewinnung der Öle oder Lipide aus den Pflanzen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt eine Nukleinsäuresequenz enthält ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23 oder SEQ ID NO: 25.

3. Verfahren nach den Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen um Arachidonsäure, Eicosapentaensäure oder Docosahexaensäure handelt.

4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sich bei der mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen um Arachidonsäure handelt.

5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass sich bei der mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen um Eicosapentaensäure oder Docosahexaensäure handelt.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Arachidonsäure oder die Eicosapentaensäure mit einem Gehalt von mindestens 15 Gew.-% bezogen auf den Gesamttriglyceridgehalt in der transgenen Pflanze vorhanden ist.

7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Docosahexaensäure mit einem Gehalt von mindestens 4 Gew.-% bezogen auf den Gesamttriglyceridgehalt in der transgenen Pflanze vorhanden ist.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass in den Triglyceriden weniger als 0,5 Gew.-% bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt der Triglyceride einer mehrfach ungesättigten Fettsäure ausgewählt aus der Gruppe der C22:4<sup>Δ7,10,13,16</sup>-, C22:5<sup>Δ4,7,10,13,16</sup>- oder C22:5<sup>Δ7,10,13,16,19</sup>-Fettsäure vorhanden ist.

9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der transgenen Pflanze um eine Ölfruchtpflanze oder Nutzpflanze handelt.

10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die transgene Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor (*Carthamus tinctoria*), Mohn, Senf, Hanf, Rizinus, Olive, Sesam, Calendula, Punica, Nachtkerze, Königskerze, Distel, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Ölpalme, Kokosnuss, Walnuss, Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok oder Pfeffer,.

11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen aus den Ölen oder Lipiden in Form der freien Fettsäuren isoliert werden.

12. Verfahren zur Herstellung von Fettsäurezusammensetzungen durch Mischen von Ölen, Lipiden oder freien Fettsäuren hergestellt nach dem Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 11 mit tierischen, mikrobiellen oder pflanzlichen Ölen, Lipiden oder Fettsäuren.

13. Verwendung von Öl, Lipide oder Fettsäuren hergestellt nach dem Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 11 oder Fettsäurezusammensetzungen hergestellt gemäß Anspruch 12 in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

14. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit Δ-6-Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,

b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Sequenz codieren, oder

c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 70 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2 codieren und eine Δ-6-Desaturaseaktivität aufweisen.

15. Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit Δ-6-Elongaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 7 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 8 dargestellten Sequenz codieren, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 oder SEQ ID NO: 7 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 70 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 oder SEQ ID NO: 8 codieren und eine  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität aufweisen.

16. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 9 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 10 dargestellten Sequenz codieren, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 9 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 10 codieren und eine  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität aufweisen.

17. Isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 23 dargestellten Sequenz,
- b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 24 dargestellten Sequenz codieren, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 23 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 24 codieren und eine  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität aufweisen.

18. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 25 dargestellten Sequenz, oder
- b) Nukleinsäuresequenzen, die für ein Protein mit der in SEQ ID NO: 26 dargestellten Sequenz codieren, oder
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 25 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 26 codieren und eine  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität aufweisen.

19. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach den Ansprüchen 14 bis 18, wobei die Sequenz von einem Mikroorganismus oder einer Pflanze stammt.

20. Protein, das von einer isolierten Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 14 bis 19 codiert wird.

21. Genkonstrukt, enthaltend eine isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 14 bis 19, wobei die Nukleinsäure funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist.

22. Genkonstrukt nach Anspruch 21, 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, Allenoxyd-Synthasen, Hydroperoxyd-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n).

23. Genkonstrukt nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt zusätzliche Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthält ausgewählt aus der Gruppe der  $\Delta$ -4-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -12-Desaturasen oder  $\Delta$ -9-Elongasen.

24. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach den Ansprüchen 14 bis 19 oder ein Genkonstrukt nach Anspruch 21 oder 22.

25. Transgener nicht-humaner Organismus, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure nach den Ansprüchen 14 bis 19, ein Genkonstrukt nach Anspruch 21 oder 22 oder einen Vektor nach Anspruch 24.

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

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1: Verschiedene Synthese-Wege zur Biosynthese von DHA (Docosahexensäure)

