

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. August 2003 (07.08.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/064638 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/00221

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. Januar 2003 (13.01.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 03 713.2 30. Januar 2002 (30.01.2002) DE
102 05 607.2 11. Februar 2002 (11.02.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **BASF PLANT SCIENCE GMBH** [DE/DE]; Carl-
Bosch-Strasse 38, 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **LERCHL, Jens**
[DE/SE]; Onsjövägen 17, S-268 31 Svalöv (SE). **HEINZ,**
Ernst [DE/DE]; Püttkampsweg 13, 22609 Hamburg (DE).
ZANK, Thorsten [DE/DE]; Lorenzengasse 13, 22303
Hamburg (DE).

(74) Anwalt: **BIEBERBACH, Andreas**; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

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

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

(54) Title: NOVEL ELONGASE GENE AND METHOD FOR PRODUCING POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

(54) Bezeichnung: NEUES ELONGASEGEN UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG MEHRFACH UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN

(57) Abstract: The invention relates to a novel elongase gene comprising the sequence SEQ ID NO:1 or the homologues, derivatives or analogues thereof, to a gene construct comprising said gene or the homologues, derivatives or analogues thereof, and to the use of the same. The invention also relates to vectors or organisms having an elongase gene comprising the sequence SEQ ID NO:1 or the homologues, derivatives or analogues thereof. The invention further relates to a method for producing polyunsaturated fatty acids and to a method for introducing DNA into organisms which produce large quantities of oils, especially oils having a high unsaturated fatty acid content. Disclosed is also an oil and/or a fatty acid composition having a higher content of polyunsaturated fatty acids comprising at least two double bonds, and/or a triacylglycerine composition having a higher content of polyunsaturated fatty acids comprising at least two double bonds.

(57) Zusammenfassung: Diese Erfindung betrifft ein neues Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1 oder seine Homologa, Derivate oder Analoga, ein Genkonstrukt, das dieses Gen oder seine Homologa, Derivate oder Analoga umfasst, sowie seine Verwendung. Die Erfindung betrifft zudem Vektoren oder Organismen, die ein Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1 oder seine Homologa, Derivate oder Analoga umfassen. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren und ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Organismen, die grosse Mengen an Ölen und insbesondere Ölen mit hohem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren produzieren. Ausserdem betrifft die Erfindung ein Öl und/oder eine Fettsäurezusammensetzung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und/oder eine Triacylglycerin-Zusammensetzung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen.



WO 03/064638 A2

Neues Elongasegen und Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren

5 Beschreibung

- Diese Erfindung betrifft ein neues Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1 oder seine Homologa, Derivate oder Analoga, ein Genkonstrukt, das dieses Gen oder seine Homologa, Derivate oder
- 10 Analoga umfasst, sowie seine Verwendung. Die Erfindung betrifft zudem Vektoren oder Organismen, die ein Elongasegen mit der Sequenz SEQ ID NO:1 oder seine Homologa, Derivate oder Analoga umfassen.
- 15 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren und ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Organismen, die große Mengen an Ölen und insbesondere Ölen mit hohem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren produzieren. Außerdem betrifft die Erfindung ein Öl und/oder eine Fettsäure-
- 20 zusammensetzung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen und/oder eine Triacylglycerin-Zusammensetzung mit höherem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen.
- 25 Bestimmte Produkte und Nebenprodukte natürlich vorkommender Stoffwechselprozesse in mikrobiellen Zellen oder in den Zellen von Tieren und vorteilhaft Pflanzen sind für ein breites Spektrum an Industrien, einschließlich der Futtermittel-, Nahrungsmittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie, nützlich. Zu diesen
- 30 gemeinsam als "Feinchemikalien" bezeichneten Molekülen gehören auch Lipide und Fettsäuren, unter denen eine beispielhafte Klasse die mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) werden beispielsweise Nahrungsmittel für Kinder zugegeben, um einen höheren
- 35 Nährwert dieser Nahrungsmittel zu erzeugen. PUFAs haben zum Beispiel einen positiven Einfluss auf den Cholesterinspiegel im Blut von Menschen und eignen sich daher zum Schutz gegen Herzkrankheiten. Feinchemikalien wie mehrfach ungesättigte Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) lassen sich
- 40 aus tierischen Quellen, wie beispielsweise Fisch, isolieren oder mit Mikroorganismen durch Züchtung von Mikroorganismen, die so entwickelt worden sind, dass sie große Mengen eines oder mehrerer gewünschter Moleküle produzieren und akkumulieren oder sezernieren, im großen Maßstab herstellen.

2

Besonders geeignete Mikroorganismen zur Herstellung von PUFAs sind Mikroorganismen, wie die Algen *Phaeodactylum tricornutum* oder *Cryptothecodinium*-Arten, Ciliaten, wie *Stylonicchia* oder *Colpidium*, Pilze, wie *Mortierella*, *Entomophthora*, *Mucor*. Durch Stammselektion ist eine Anzahl von Mutantenstämmen der entsprechenden Mikroorganismen entwickelt worden, die eine Reihe wünschenswerter Verbindungen, einschließlich PUFAs, produzieren. Die Selektion von Stämmen mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls ist jedoch ein zeitraubendes und schwieriges Verfahren.

Alternativ kann die Produktion von Feinchemikalien geeigneterweise über die Produktion von Pflanzen, die so entwickelt sind, dass sie die vorstehend genannten PUFAs herstellen, im großen Maßstab durchgeführt werden. Besonders gut für diesen Zweck geeignete Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Canola, Lein, Soja, Sonnenblumen, Disteln, Borretsch und Nachtkerze. Aber auch andere Nutzpflanzen, die Öle oder Lipide und Fettsäuren enthalten, sind gut geeignet, wie in der eingehenden Beschreibung dieser Erfindung erwähnt. Mittels herkömmlicher Züchtung, über die Selektion geeigneter Pflanzen, ist eine Reihe von Mutantpflanzen entwickelt worden, die ein Spektrum an wünschenswerten Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen produzieren. Die Selektion neuer Pflanzensorten mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls ist jedoch ein zeitaufwändiges und schwieriges Verfahren oder sogar unmöglich, wenn die Verbindung in der entsprechenden Pflanze nicht natürlich vorkommt, wie im Fall von mehrfach ungesättigten C₂₀-Fettsäuren und solchen mit längeren Kohlenstoffketten.

Aufgrund der positiven Eigenschaften ungesättigter Fettsäuren hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine Δ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine Δ -15-Desaturase in WO 94/11516 wird eine Δ -12-Desaturase beansprucht. Δ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, WO 96/21022 und WO 99/27111 beschrieben. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659 beschrieben. In WO 96/13591 wird eine Δ -6-Palmitoyl-ACP-Desaturase beschrieben und beansprucht. Die biochemische

3

Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und charakterisieren sind (McKeon et al., *Methods in Enzymol.* 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., *Plant Physiol. Biochem.*, 26, 1988: 777-792).

In Hefen konnte sowohl eine Verschiebung des Fettsäurespektrums zu ungesättigten Fettsäuren hin als auch eine Steigerung der Produktivität nachgewiesen werden (siehe Huang et al., *Lipids* 34, 1999: 649-659, Napier et al., *Biochem. J.*, Vol. 330, 1998: 611-614). Die Expression der verschiedenen Desaturasen in transgenen Pflanzen zeigte allerdings nicht den gewünschten Erfolg. Eine Verschiebung des Fettsäurespektrums zu ungesättigten Fettsäuren hin konnte gezeigt werden, gleichzeitig zeigte sich aber, dass die Syntheseleistung der transgenen Pflanzen stark nachließ, das heißt gegenüber den Ausgangspflanzen konnten nur geringere Mengen an Ölen isoliert werden.

Die Klonierung und Expression von Elongasen, die ungesättigte Fettsäuren als Substrat der enzymatischen Reaktion um mindestens zwei C-Atome elongieren, wurde bisher weder in Hefen noch in Pflanzen beschrieben.

Das heißt weder in Hefen noch in Kulturpflanzen werden natürlicherweise mehrfach ungesättigte C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) hergestellt.

Nach wie vor besteht daher ein großer Bedarf an neuen Genen, die für Enzyme kodieren, die an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind und es ermöglichen, diese in einem technischen Maßstab herzustellen. Ein besonders hoher Bedarf besteht für Elongasen, die ungesättigte Fettsäuren um mindestens zwei C-Atome elongieren. Keines der bisher bekannten biotechnologischen Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren liefert die vorgenannten Fettsäuren in wirtschaftlich nutzbaren Mengen.

Bei der Expression von Genen in Pflanzen gibt es immer wieder Probleme, das heißt es kommt durch die Expression nicht zur erwarteten Steigerung bei der Herstellung des gewünschten Wertprodukts.

Es bestand daher die Aufgabe neue Elongasegene zu identifizieren, zu klonieren und zu exprimieren und sie dadurch für die Synthese ungesättigter Fettsäuren wie mehrfach ungesättigte C₂₀- und/oder

4

C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) zur Verfügung zu stellen.

- 5 Diese Aufgabe wurde durch die erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäure gelöst, die für ein Polypeptid kodiert, das C₁₆- oder C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert, wobei die Fettsäuren C_{18:3}^{Δ5t,9,12}, C_{20:3}^{Δ8,11,14}, C_{20:4}^{Δ5,8,11,14} und C_{20:5}^{Δ5,8,11,14,17} nicht verlängert werden.

Vorteilhaft wird die Aufgabe durch eine isolierte Nukleinsäure gelöst, umfassend eine Nukleotidsequenz, die ein Polypeptid kodiert, das C₁₆- oder C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül verlängert, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus

- a) einer in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz,
- 20 b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich gemäß dem degenerierten genetischen Code von der in SEQ ID NO:2 dargestellten Sequenz ableitet,
- c) Derivate der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, die Polypeptide mit mindestens 50 % Homologie zu der Sequenz kodiert, die die Aminosäuresequenzen in SEQ ID NO:2 kodiert, wobei die Sequenz als C₁₆- oder C₁₈-Elongase wirkt.

Vorteilhaft verlängert die Nukleotidsequenz ausgewählt aus der vorgenannten Gruppe von C₁₆- oder C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome, wobei die folgenden Fettsäuren C_{18:3}^{Δ5t,9,12}, C_{20:3}^{Δ8,11,14}, C_{20:4}^{Δ5,8,11,14} und C_{20:5}^{Δ5,8,11,14,17} jedoch nicht verlängert werden. Bevorzugt werden C₁₆- oder C₁₈-Fettsäuren mit zwei, drei oder vier Doppelbindungen im Fettsäuremolekül verlängert. Während Fettsäuren wie C_{18:3}^{Δ5t,9,12}, C_{20:3}^{Δ8,11,14}, C_{20:4}^{Δ5,8,11,14} und C_{20:5}^{Δ5,8,11,14,17} nicht verlängert werden, werden Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe C_{18:2}^{Δ9,12}, C_{18:3}^{Δ4,7,10}, C_{18:3}^{Δ5,8,11}, C_{18:3}^{Δ6,9,12}, C_{18:3}^{Δ7,10,13}, C_{18:3}^{Δ8,11,14}, C_{18:3}^{Δ9,12,15}, C_{18:4}^{Δ6,9,12,15}, C_{18:3}^{Δ5c,9,12} oder C_{16:3}^{Δ7,10,13} elongiert. Die erfindungsgemäßen Elongasen zeigen eine Präferenz gegenüber C_{18:3}^{Δ6,9,12-}, C_{18:4}^{Δ6,9,12,15-} und C_{16:3}^{Δ7,10,13}-Fettsäuren, die vorteilhaft mindestens um den Faktor 1,5, bevorzugt mindestens um den Faktor 1,6, besonders bevorzugt mindestens um den Faktor 1,7 oder ganz besonders bevorzugt mindestens um den Faktor 1,8 höher ist als gegenüber den ungesättigten Fettsäuren wie C_{18:2}^{Δ9,12-}, C_{18:3}^{Δ4,7,10-}, C_{18:3}^{Δ5,8,11-},

5

$C_{18:3}^{\Delta 7,10,13-}$, $C_{18:3}^{\Delta 8,11,14-}$, $C_{18:3}^{\Delta 9,12,15-}$ oder $C_{18:3}^{\Delta 5,c9,12-}$ -Fettsäuren.

- Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, die C_{16} - oder
- 5 C_{18} -Fettsäuren elongieren, stammen ursprünglich vorteilhaft aus Pilzen bevorzugt aus Pilzen wie den Oomyzeten zum Beispiel Oomyzeten wie die der Gattung *Phytophthora*, besonders bevorzugt aus Oomyzeten der Gattung und Art *Phytophthora infestans*.
- 10 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können zur Modifikation von Ölen, Fettsäuren, Lipiden, von Lipiden stammenden Verbindungen und am stärksten bevorzugt zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren verwendet werden.
- 15 Als Wirtsorganismen für die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eignen sich vorteilhaft Mikroorganismen, wie *Phaeodactylum*, *Colpidium*, *Mortierella*, *Entomophthora*, *Mucor*, *Cryptocodium* sowie andere Algen und Pilze und Pflanzen, insbesondere Ölfruchtpflanzen, die in der Industrie zur Produktion einer Vielzahl von
- 20 Feinchemikalien im großen Maßstab verwendet werden.

- Mit den in beispielsweise in WO 98/01572 offenbarten Klonierungsvektoren und Techniken zur genetischen Manipulation der oben-
- 25 genannten Mikroorganismen und Ciliaten oder den in Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1(3):239-251, sowie Dunahay et al., 1995, *Genetic transformation of diatoms*, *J. Phycol.* 31:10004-1012 und den Zitaten darin für Algen und verwandten Organismen, wie *Phaeodactylum tricorutum* beschriebenen Methoden und Vektoren, können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle
- 30 zur gentechnologischen Veränderung dieser Organismen verwendet werden, so dass sie bessere oder effizientere Produzenten einer oder mehrerer Feinchemikalien werden. Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie kann durch eine direkte Wirkung der Manipulation einer erfindungs-
- 35 gemäßen Nukleinsäure vorteilhaft in Form des gesamten Gens oder durch eine indirekte Wirkung dieser Manipulation hervorgerufen werden.

- Moose und Algen sind die einzigen bekannten Pflanzensysteme,
- 40 die erhebliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) herstellen. Auch pilzliche Systeme wie Oomyzeten (Eukarioten/Stramenopiles/Oomyzeten/Phythialen/Pythiaceen) stellen die vorgenannten Fettsäuren her. Daher eignen
- 45 sich Nukleinsäuremoleküle, die einem Oomyzet wie *Phytophthora infestans* stammen, besonders zur Modifikation des Lipid- und PUFA-Produktionssystems in einem Wirt, insbesondere in Mikro-

6

organismen, wie den vorstehend erwähnten Mikroorganismen, und Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, beispielsweise Raps, Canola, Lein, Soja, Sonnenblumen, Borretsch. Ferner können Nukleinsäuren aus einem Oomyzet wie *Phytophthora infestans* zur Identifikation solcher DNA-Sequenzen und Enzyme in anderen Arten, die sich zur Modifikation der Biosynthese von Vorläufermolekülen von PUFAs in den entsprechenden Organismen eignen, verwendet werden.

Der Pilz *Phytophthora infestans* ist ein Mitglied der Oomyzeten. Er ist mit anderen Pilzen verwandt, die in Abwesenheit von Licht wachsen kann. Pilze, wie *Phytophthora*, sind auf DNA-Sequenz- und Polypeptid-Ebene sehr homolog zueinander, was die Verwendung von heterologem Screening von DNA-Molekülen mit von anderen Pilzen oder Organismen stammenden Sonden ermöglicht, so dass bei vorhandenen sein weiterer Nukleinsäuresequenzen neben der erfindungsgemäßen Sequenz eine Konsensussequenz abgeleitet werden kann, die sich zum heterologen Screening oder zur funktionellen Kommentierung und Vorhersage von Genfunktionen in dritten Arten eignet. Derzeit ist eine Vorhersage der Funktion der durch die Sequenzen kodierten Proteine bzw. Enzyme jedoch noch nicht möglich. Die Fähigkeit, diese Funktionen zu identifizieren, z.B. die Vorhersage der Substratspezifität von Enzymen, kann daher von signifikanter Bedeutung sein. Ferner können diese Nukleinsäuremoleküle als Bezugssequenzen zur Kartierung anderer Pilze oder zur Ableitung von PCR-Primern dienen.

Weiterhin wurde zum ersten mal ein funktionell aktives PSE Gen aus dem Oomyzeten *Phytophthora infestans* isoliert (Eukarioten/Stramenopiles, Oomyzeten/Phythialen/Pythiaceen). Das Gen ist vorteilhaft zur Produktion langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren geeignet, vorzugsweise mit mehr als sechzehn oder achtzehn Kohlenstoffatomen im Kohlenstoffgrundgerüst der Fettsäure und/oder mindestens zwei Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette, geeignet ist, wobei die durch die erfindungsgemäße Sequenz kodierte Enzyme eine Präferenz gegenüber den oben genannten Fettsäuren bei der Elongierung aufweisen.

Dieses neue Nukleinsäuremolekül kodiert für ein Protein, das hier als PUFA-spezifische Elongase (PSEs oder im Singular PSE bezeichnet werden). Diese PSEs können beispielsweise eine Funktion ausüben, die am Stoffwechsel (z.B. an der Biosynthese oder am Abbau) von Verbindungen, die zur Lipid- oder Fettsäuresynthese notwendig sind, wie PUFAs, beteiligt sind oder am Transmembrantransport einer oder mehrerer Lipid-/Fettsäureverbindungen entweder in die oder aus der Zelle teilnehmen.

In dieser neuen Anmeldung wird die Funktion der Sequenz eingehender dargestellt. Wir haben zum ersten Mal ein funktionell aktives Oomycetengen isoliert, das zur Produktion langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren, vorzugsweise mit mehr als sechzehn oder
5 achtzehn Kohlenstoffatomen im Kohlenstoffgrundgerüst der Fettsäure und/oder mindestens zwei Doppelbindungen in der Kohlenstoffkette, geeignet ist, wobei die durch die erfindungsgemäßen Sequenzen kodierte Enzyme eine Präferenz gegenüber den oben genannten Fettsäuren bei der Elongierung aufweisen. Daher ist
10 hierin von einem PSE-Gen oder -Protein die Rede. Andere Veröffentlichungen und Patente offenbaren oder zeigen kein funktionell aktives PSE-Gen, obgleich es verschiedene bekannte Patentanmeldungen gibt, welche die Verlängerung gesättigter Fettsäuren mit kurzer oder mittlerer Kette (WO 98/46776 und US 5,475,099) oder
15 die Verlängerung oder Produktion langkettiger Fettsäuren, die dann aber nicht mehr als eine Doppelbindung haben oder zu langkettigen Fettsäure-Wachsestern führen (siehe: WO 98/54954, WO 96/13582, WO 95/15387) zeigen.

20 WO 99/64616, WO 98/46763, WO 98/46764, WO 98/46765 beschreiben zwar die Herstellung von PUFAs in transgenen Pflanzen und zeigen die Klonierung und funktionelle Expression entsprechender Desaturase-Aktivitäten, insbesondere aus Pilzen, zeigen aber kein unumgängliches PSE-kodierendes Gen und keine funktionelle PSE-
25 Aktivität. Die Herstellung einer Triensäure mit C₁₈-Kohlenstoffkette ist gezeigt und anhand von gamma-Linolensäure beansprucht worden, es wurde jedoch bisher nicht die Herstellung sehr langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren (mit C₂₀- und längerer Kohlenstoffkette sowie von Triensäuren und höher ungesättigten
30 Typen) und die Substratspezifität der Elongase gelehrt.

Zur Herstellung langkettiger PUFAs müssen die mehrfach ungesättigten C₁₆- und/oder C₁₈-Fettsäuren durch die enzymatische Aktivität einer Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome ver-
35 längert werden. Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz kodiert die erste pilzliche Elongase, die C₁₆- und/oder C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängern kann. Nach einer Elongationsrunde führt diese Enzymaktivität zu C₂₀-Fettsäuren, und nach zwei,
40 drei und vier Elongationsrunden zu C₂₂-, C₂₄- oder C₂₆-Fettsäuren. Von Vorteil bei der erfindungsgemäßen enzymatischen Aktivität ist, dass nicht alle ungesättigten C₂₀-Fettsäuren verlängert werden. Dies ermöglicht die spezifische Synthese einzelner wünschenswerter ungesättigter Fettsäuren bzw. Fettsäuregemische.
45 Mit der erfindungsgemäßen Elongase können auch längere PUFAs synthetisiert werden. Die Aktivität der erfindungsgemäßen Elongasen führt vorzugsweise zu C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens

zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei oder vier Doppelbindungen, besonders bevorzugt sind Fettsäuren mit einer Doppelbindung in $\Delta 6$ Position. Nachdem die Verlängerung mit den erfindungsgemäßen Enzymen stattgefunden hat, können weitere Desaturierungsschritte erfolgen. Daher führen die Produkte der Elongaseaktivität und der möglichen weiteren Desaturierung zu bevorzugten PUFAs mit einem höheren Desaturierungsgrad, wie Docosadiensäure, Arachidonsäure, $\omega 6$ -Eicosatriendihomo- γ -linolensäure, Eicosapentensäure, $\omega 3$ -Eicosatriensäure, $\omega 3$ -Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure. Substrate der erfindungsgemäßen Enzymaktivität sind zum Beispiel Taxolsäure; 6,9-Octadecadiensäure, Linolsäure, γ -Linolensäure, Pinolensäure, α -Linolensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure, γ -Linolensäure und/oder α -Linolensäure. Die C_{16} - und/oder C_{18} -Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße enzymatische Aktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglycerin, Diacylglycerin oder Triacylglycerin, verlängert werden.

Unter der Verwendung von Klonierungsvektoren, die zur Verwendung in Pflanzen und zur Pflanzentransformation geeignet sind, wie denjenigen, die in Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, 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)) und den in diesen Schriften genannten Zitaten veröffentlicht worden sind, lassen sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Pflanzen verwenden, so dass diese ein besserer oder effizienterer Produzent eines oder mehrerer von Lipiden hergeleiteter Produkte, wie PUFAs, wird. Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion eines von Lipiden hergeleiteten Produktes, wie PUFAs, kann durch direkte Wirkung der Manipulation oder eine indirekte Wirkung dieser Manipulation hervorgerufen werden.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung eines erfindungsgemäßen PSE-Proteins die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einer Ölfruchtpflanze oder einem Mikroorganismus aufgrund eines veränderten Proteins direkt beeinflussen kann. Die Anzahl oder

9

Aktivität des PSE-Proteins, -nukleinsäure und/oder -Gens kann erhöht sein, so dass größere Mengen dieser Verbindungen de novo hergestellt werden, weil den Organismen diese Aktivität und Fähigkeit zur Biosynthese vor dem Einbringen der entsprechenden Nukleinsäure und/oder des entsprechenden Gens fehlte.

Das Einbringen einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure und/oder eines PSE-Gens in einen Organismus oder eine Zelle kann nicht nur den Biosynthesefluss zum Endprodukt erhöhen, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin-Zusammensetzung erhöhen oder de novo schaffen. Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer Gene, die am Import von Nährstoffen, die zur Biosynthese einer oder mehrerer Feinchemikalien (z.B. Fettsäuren, polaren und 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. Fettsäuren und Lipide sind selbst als Feinchemikalien wünschenswert; durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl einer oder mehrerer PSEs, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer PSEs, 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 oder Mikroorganismen zu steigern.

Die Mutagenese des erfindungsgemäßen PSE-Gens bzw. der Nukleinsäure kann auch zu einem PSE-Protein mit geänderten Aktivitäten führen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien direkt oder indirekt beeinflussen. Beispielsweise kann die Anzahl oder Aktivität des erfindungsgemäßen PSE-Gens bzw. der Nukleinsäure gesteigert werden, so dass die normalen Stoffwechselabfälle oder -nebenprodukte der Zelle (deren Menge möglicherweise aufgrund der Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie erhöht ist) effizient exportiert werden, bevor sie andere Moleküle oder Prozesse innerhalb der Zelle (welche die Lebensfähigkeit der Zelle senken würden) zerstören oder die Biosynthesewege der Feinchemikalie stören würden (wodurch die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion der gewünschten Feinchemikalie verringert wird). Ferner können die relativ großen intrazellulären Mengen der gewünschten Feinchemikalie selbst toxisch für die Zelle sein oder Enzym-Rückkopplungsmechanismen, wie die allosterische Regulation, stören, beispielsweise könnte sie durch Steigerung der Aktivität oder Anzahl anderer stromabwärts folgender Enzyme oder Entgiftungsenzyme des PUFA-Wegs die Allokation der PUFA in die Triacyl-

10

- gylcerin-Fraktion steigern, man könnte die Lebensfähigkeit von Saatzellen erhöhen, was wiederum zu besserer Entwicklung von Zellen in Kultur oder zu Saaten führt, die die gewünschte Feinchemikalie produzieren. Die erfindungsgemäßen PSE-Gene bzw.
- 5 Nukleinsäuren können auch so manipuliert werden, dass die entsprechenden Mengen der verschiedenen Lipid- und Fettsäuremoleküle hergestellt werden. Dies kann eine einschneidende Wirkung auf die Lipidzusammensetzung der Membran der Zelle haben und erzeugt neue Öle zusätzlich zum Auftreten neusynthetisierter PUFAs. Da jeder
- 10 Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften hat, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität erheblich verändern. Änderungen der Membranfluidität können sich auf den Transport von Molekülen über die Membran sowie auf die Unversehrtheit der Zelle auswirken, die
- 15 beide eine entscheidende Wirkung auf die Produktion von Feinchemikalien besitzen. In Pflanzen können diese Änderungen überdies auch andere Merkmale, wie Toleranz gegenüber abiotischen und biotischen Stresssituationen, beeinflussen.
- 20 Biotische und abiotische Stresstoleranz ist ein allgemeines Merkmal, das man an ein breites Spektrum von Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Distel, Baumwolle, Raps und Canola, Maniok, Pfeffer, Sonnenblume und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel,
- 25 Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte, vererben möchte. Diese Feldfrüchte sind als weitere erfindungsgemäße Ausführungsform auch bevorzugte Zielpflanzen für die Gentechnologie.
- 30 Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Sojabohne, Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Diestel, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Alfalfa, oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee).
- 35
- Folglich betrifft ein Aspekt der Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle (z.B. cDNAs), umfassend eine Nukleotidsequenz, die eine PSE oder biologisch aktive Teile davon kodiert, oder Nukleinsäurefragmente, die sich als Primer oder Hybridisierungs-
- 40 sonden zum Nachweis oder zur Amplifikation PSE-kodierender Nukleinsäuren (z.B. DNA oder mRNA) eignen. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Nukleinsäuremolekül eine der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleotidsequenzen oder die kodierende Region oder ein Komplement einer dieser Nukleotid-
- 45 sequenzen. Bei anderen besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die an eine Nukleotidsequenz, wie in

11

der Sequenz SEQ ID NO:1 dargestellt, oder einen Teil davon hybridisiert oder zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 5 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog dazu ist, wobei unter Homologie im Sinne der Erfindung Identität zu verstehen ist. Bei anderen bevorzugten Ausführungsformen kodiert das isolierte Nukleinsäuremolekül eine der in der Sequenz SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenzen. Das bevorzugte erfindungsgemäße 10 PSE-Gen bzw. die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz besitzt vorzugsweise auch mindestens eine der hier beschriebenen PSE-Aktivitäten.

Bei einer weiteren Ausführungsform kodiert das isolierte 15 Nukleinsäuremolekül ein Protein oder einen Teil davon, wobei das Protein oder der Teil davon eine Aminosäuresequenz enthält, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO:2 ist, dass das Protein oder der Teil davon eine PSE-Aktivität beibehält, wobei unter Homologie im Sinne der Erfindung 20 Identität zu verstehen ist. Vorzugsweise behält das Protein oder der Teil davon, das/der von dem Nukleinsäuremolekül kodiert wird, die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen von Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen. Bei einer Ausführungs- 25 form ist das von dem Nukleinsäuremolekül kodierte Protein zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO:2. Bei 30 einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Protein ein Voll-längen- Phytophthora infestans-Protein, das im wesentlichen homolog zu einer gesamten Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 (die von dem in SEQ ID NO:1 gezeigten offenen Leserahmen her rührt) ist.

35 Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform rührt das isolierte Nukleinsäuremolekül von Phytophthora infestans her und kodiert ein Protein (z.B. ein PSE-Fusionsprotein), das eine biologisch aktive Domäne enthält, die zu mindestens etwa 50 % oder mehr 40 homolog (identisch) zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO:2 ist und die Fähigkeit, am Stoffwechsel von Pilzen zum Aufbau von ungesättigten Fettsäuren notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über Membranen teilzunehmen, beibehält oder zumindest eine der in der Tabelle I aufgeführten Aktivitäten 45 besitzt, und umfasst auch heterologe Nukleinsäuresequenzen, die ein heterologes Polypeptid oder regulatorische Proteine kodieren.

12

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren codieren für Proteine, die Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe $C_{18:2}^{\Delta 9,12}$, $C_{18:3}^{\Delta 4,7,10}$, $C_{18:3}^{\Delta 5,8,11}$, $C_{18:3}^{\Delta 6,9,12}$, $C_{18:3}^{\Delta 7,10,13}$, $C_{18:3}^{\Delta 8,11,14}$, $C_{18:3}^{\Delta 9,12,15}$, $C_{18:4}^{\Delta 6,9,12,15}$, $C_{18:3}^{\Delta 5c,9,12}$ oder $C_{16:3}^{\Delta 7,10,13}$ elongieren, während 5 Fettsäuren wie $C_{18:3}^{\Delta 5t,9,12}$, $C_{20:3}^{\Delta 8,11,14}$, $C_{20:4}^{\Delta 5,8,11,14}$ und $C_{20:5\Delta 5,8,11,14,17}$ nicht verlängert werden. Das PSE Gen wurde heterolog in Hefe exprimiert und verschiedene mehrfach(poly)-ungesättigte Fettsäuren wurden einzeln gefüttert und von dem transformierten Hefen umgesetzt. Analysiert wurden Fettsäureprofile von transgenen 10 Hefen mittels GLC. Der Prozentsatz von umgesetzten gefütterten Fettsäuren wurde folgendermaßen berechnet: mol% (Produkt)x100/[mol%(Edukt) + mol%(Produkt)].

Tabelle I gibt Fettsäuren wieder, die durch das erfindungsgemäße 15 Enzym elongiert werden.

20

25

30

35

40

45

Tabelle I: Fettsäuren (in mol%) von Hefezellen transformiert mit dem Plasmid pYES2 (Kontrolle) und pY2piPSE1. Gefüttert wurden 18:2, γ -18:3, α -18:3 oder 18:4 Fettsäuren. Die gesamte Lipidfraktion wurde transmethyliert und das Fettsäureprofil mittels GC bestimmt. Berechnung %-Elongation: 100 x mol% (Produkt)/[mol%(Edukt) + mol%(Produkt)]. Substrate und elongierte Fettsäuren werden im Fettdruck wiedergegeben.

Fatty acids	% of total fatty acids											
	pYES2						PY2piPSE1					
	+18:2	+ γ -18:3	+ α -18:3	+18:4	+18:2	+ γ -18:3	+ α -18:3	+18:4	+18:2	+ γ -18:3	+ α -18:3	+18:4
16:0	13.7	16.4	14.3	19.5	9.8	9.8	7.3	10.6				
16:1 ^{Δ9}	8.8	6.5	3.4	7.8	9.9	4.1	1.3	2.3				
18:0	6.9	9.9	11.3	13.3	8.6	12.3	14.4	19.4				
18:1 ^{Δ9}	9.9	10.5	6.0	13.6	15.3	11.8	5.6	8.4				
18:2 ^{Δ9,12}	60.7	-	-	-	41.0	-	-	-				
18:3 ^{Δ6,9,12}	-	56.7	-	-	-	51.1	-	-				
18:3 ^{Δ9,12,15}	-	-	64.7	-	-	-	65.1	-				
18:4 ^{Δ6,9,12,15}	-	-	-	45.7	-	-	-	48.3				
20:2 ^{Δ11,14}	-	-	-	-	2.1	-	-	-				
20:3 ^{Δ8,11,14}	-	-	-	-	-	11.0	-	-				
20:3 ^{Δ11,14,17}	-	-	-	-	-	-	-	-				
20:4 ^{Δ8,11,14,17}	-	-	-	-	-	-	-	-				
%elongation	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.9	17.7	8.7	18.5				

Bei einer anderen Ausführungsform ist das isolierte Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen an ein Nukleinsäuremolekül, das eine
5 Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 umfasst. Vorzugsweise entspricht das isolierte Nukleinsäuremolekül einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Stärker bevorzugt kodiert das isolierte Nukleinsäuremolekül natürlich vorkommende *Phytophthora infestans*-PSE oder einen biologisch aktiven Teil davon.

10

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, z.B. rekombinante Expressionsvektoren, die mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül enthalten, und Wirtszellen, in die diese Vektoren eingebracht worden sind, insbesondere Mikro-
15 organismen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe, -organe oder ganze Pflanzen. Auch nicht humane tierische Wirtszellen wie beispielsweise *Caenorhabditis elegans* können vorteilhaft verwendet werden. Bei einer Ausführungsform kann eine solche Wirtszelle Feinchemikalien-Verbindungen, insbesondere PUFAs, speichern; zur
20 Isolation der gewünschten Verbindung werden die Zellen geerntet. Die Verbindung (Öle, Lipide, Triacylglyceride, Fettsäuren) oder die PSE können dann aus dem Medium oder der Wirtszelle, welche bei Pflanzen Zellen sind, die Feinchemikalien enthalten oder speichern, am stärksten bevorzugt Zellen von Speichergeweben,
25 wie Samenhüllen, Knollen, Epidermis- und Samenzellen, isoliert werden.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine genetisch veränderte Pflanze (= transgene Pflanze), bevorzugt ein Ölfrucht-
30 pflanze, wie vorstehend erwähnt oder einen genetisch veränderte Pilz (= transgener Pilz), besonders bevorzugt einen Pilz aus der Gattung *Phytophthora* oder eine Pflanze, in die ein PSE-Gen bevorzugt aus einem Oomyzeten wie vorteilhaft *Phytophthora infestans* eingebracht worden ist oder in der ein PSE-Gen verändert worden
35 ist. Bei einer Ausführungsform ist das Genom von *Phytophthora infestans* durch Einbringen eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls, das eine Wildtyp- oder mutierte PSE-Sequenz kodiert, als Transgen verändert worden. Bei einer anderen Ausführungsform ist ein endogenes PSE-Gen im Genom des Oomyzeten *Phytophthora*
40 *infestans* durch homologe Rekombination mit einem veränderten PSE-Gen verändert, d.h. funktionell zerstört, worden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform gehört der Pflanzenorganismus zur Gattung *Physcomitrella*, *Ceratodon* oder *Funaria*, wobei *Physcomitrella* besonders bevorzugt ist. Bei einer bevorzugten Aus-
45 führungsform wird die *Physcomitrella*-Pflanze auch zur Produktion einer gewünschten Verbindung, wie Lipiden und Fettsäuren, wobei PUFAs besonders bevorzugt sind, verwendet.

15

Bei noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann der Oomyzet *Phytophthora* zur Demonstration der Funktion eines Moosgens unter Verwendung homologer Rekombination auf der Basis der in dieser Erfindung beschriebenen Nukleinsäuren verwendet werden.

5

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäuresequenz, ein PSE-Gen oder einen Teil, z.B. einen biologisch aktiven Teil, davon. Bei einer bevorzugten Ausführungsform kann die isolierte Nukleinsäuresequenz, die PSE oder ein Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in einem Mikroorganismus oder einer Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über dessen/deren Membranen teilnehmen. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die isolierte Nukleinsäuresequenz, die PSE oder der Teil davon ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2, dass dieses Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzenzellen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen, beibehält.

Die Erfindung stellt auch eine isolierte Präparation einer PSE (PSE-Protein) bereit. Bei bevorzugten Ausführungsformen umfasst die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz bzw. das PSE-Gen eine Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein isoliertes Volllängenprotein, das im wesentlichen homolog zu einer gesamten Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 (die von dem in SEQ ID NO:1 gezeigten offenen Leserahmen kodiert wird) ist. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Protein zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog (= identisch) zu einer Aminosäuresequenz der Sequenz SEQ ID NO:2. Bei anderen Ausführungsformen umfasst die isolierte Nukleinsäuresequenz bzw. PSE eine Aminosäuresequenz, die zu mindestens etwa 50 % homolog zu einer der Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO:2 ist und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Fettsäuren in einem Mikroorganismus oder einer Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder eine oder mehrere der PUFA-verlängernden Aktivitäten hat, wobei die Verlängerung von desaturierten C₁₆- und/oder C₁₈-Kohlenstoffketten mit Doppelbindungen an mindestens zwei Stellen gemeint ist.

Alternativ kann das isolierte PSE-Protein eine Aminosäuresequenz umfassen, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 hybridisiert, z.B. unter

16

stringenten Bedingungen hybridisiert, oder zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, 80 % oder 90 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog dazu
5 ist. Es ist ebenfalls bevorzugt, dass die bevorzugten PSE-Formen ebenfalls eine der hier beschriebenen PSE-Aktivitäten besitzen.

Das PSE-Polypeptid oder ein biologisch aktiver Teil davon kann funktionsfähig mit einem nicht-PSE-Polypeptid verbunden werden,
10 so dass ein Fusionsprotein gebildet wird. Bei bevorzugten Ausführungsformen hat dieses Fusionsprotein eine Aktivität, die sich von derjenigen der PSE allein unterscheidet. Bei anderen bevorzugten Ausführungsform nimmt dieses Fusionsprotein am Stoffwechsel von Verbindungen, die vorteilhaft zur Synthese von
15 Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teil. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen moduliert das Einbringen dieses Fusionsproteins in eine Wirtszelle die Produktion einer gewünschten Verbindung wie vorteilhaft der Synthese von PUFAS durch die Zelle. Bei einer bevorzugten Ausführungsform enthalten diese Fusionsproteine auch Δ -4-,
20 Δ -5- oder Δ -6-Desaturase-Aktivitäten allein oder in Kombination.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur
25 Herstellung einer Feinchemikalie vorteilhaft von ungesättigten Fettsäuren und/oder Lipiden, die ungesättigte Fettsäuren enthalten. Dieses Verfahren beinhaltet entweder die Züchtung eines geeigneten Mikroorganismus oder die Züchtung von Pflanzenzellen, -geweben, -organen oder ganzen Pflanzen, umfassend die
30 erfindungsgemäße Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 oder ihre Homologa, Derivate oder Analoga oder ein Genkonstrukt, das die SEQ ID NO: 1 oder ihre Homologa, Derivate oder Analoga umfasst, oder einen Vektor, der diese Sequenz oder das Genkonstrukt umfasst, welches die Expression eines erfindungsgemäßen PSE-
35 Nukleinsäuremoleküls herbeiführt, so dass eine Feinchemikalie produziert wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner den Schritt Gewinnen einer Zelle, die eine solche erfindungsgemäße Elongase-Nukleinsäuresequenz enthält, wobei eine Zelle mit einer Elongase-Nukleinsäuresequenz, einem
40 Genkonstrukt oder einem Vektor, welche die Expression einer erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäure herbeiführen, transformiert wird. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren ferner den Schritt Gewinnen der Feinchemikalie aus der Kultur. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform
45 gehört die Zelle zur Ordnung der Ciliaten, zu Mikroorganismen, wie Pilzen, oder zum Pflanzenreich, insbesondere zu Ölfrucht-

17

pflanzen, besonders bevorzugt sind Mikroorganismen oder Ölfruchtpflanzen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Produktion eines Moleküls durch einen Mikroorganismus. Diese Verfahren umfassen das Zusammenbringen der Zelle mit einer Substanz, welche die PSE-Aktivität oder die PSE-Nukleinsäureexpression moduliert, so dass eine zellassozierte Aktivität relativ zu der gleichen Aktivität in Abwesenheit der Substanz verändert wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird/werden ein oder zwei Stoffwechselweg (e) der Zelle für Lipide und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzyme moduliert oder der Transport von Verbindungen über diese Membranen moduliert, so dass die Ausbeute oder die Rate der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch diesen Mikroorganismus verbessert ist. Die Substanz, welche die PSE-Aktivität moduliert, kann eine Substanz sein, welche die PSE-Aktivität oder PSE-Nukleinsäureexpression stimuliert oder die als Zwischenprodukt bei der Fettsäurebiosynthese verwendet werden kann. Beispiele für Substanzen, welche die PSE-Aktivität oder PSE-Nukleinsäureexpression stimulieren, sind u.a. kleine Moleküle, aktive PSEs sowie PSEs-kodierende Nukleinsäuren, die in die Zelle eingebracht worden sind. Beispiele für Substanzen, welche die PSE-Aktivität oder -Expression hemmen, sind u.a. kleine Moleküle und Antisense-PSE-Nukleinsäuremoleküle.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Ausbeuten einer gewünschten Verbindung aus einer Zelle, umfassend das Einbringen eines Wildtyp- oder Mutanten-PSE-Gens bzw. einer erfindungsgemäßen Wildtyp- oder Mutanten-Nukleinsäure, das entweder auf einem separaten Plasmid gehalten oder in das Genom der Wirtszelle integriert wird, in eine Zelle. Bei Integration in das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein oder durch derartige Rekombination erfolgen, dass die native Nukleinsäuresequenz oder 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 erleichternde Sequenz und mindestens eine die Polyadenylierung eines funktionell transkribierten Gens oder der Nukleinsäuresequenz erleichternde Sequenz enthält, funktionell verbunden ist.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform sind die Ausbeuten modifiziert. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die gewünschte Chemikalie vermehrt, wobei unerwünschte störende Verbindungen vermindert werden können. Bei einer besonders bevor-

18

zugten Ausführungsform ist die gewünschte Feinchemikalie ein Lipid oder eine Fettsäure, ein Cofaktor oder ein Enzym. Bei besonders bevorzugten Ausführungsform ist diese Chemikalie eine mehrfach ungesättigte Fettsäure. Stärker bevorzugt ist sie aus-
5 gewählt aus Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (AEP) oder Docosahexaensäure (DHA).

Eingehende Beschreibung der Erfindung

- 10 Die vorliegende Erfindung stellt eine PSE-Nukleinsäure und ein Proteinmolekül bereit, die am Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren, PUFA-Cofaktoren und Enzymen in dem Oomyzet *Phytophthora infestans* oder am Transport lipophiler Verbindungen über Membranen beteiligt sind. Die erfindungsgemäßen Verbindungen
15 lassen sich zur Modulation der Produktion von Feinchemikalien aus Organismen, beispielsweise Mikroorganismen, wie Ciliaten, Pilzen, Hefen, Bakterien, Algen, und/oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Diestel, Brassica-Arten, wie Raps, Diestel, Canola und
20 Rüben, Pfeffer, Sonnenblume, Borretsch, Nachtkerze und Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Maniok, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernden Gräsern und Futterfeldfrüchten, entweder direkt (z.B.
25 wenn die Überexpression oder Optimierung eines Fettsäurebiosynthese-Proteins einen direkten Einfluss auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Fettsäure aus modifizierten Organismen hat) verwenden oder können eine indirekt
30 Auswirkung haben, die dennoch zu einer Steigerung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung oder einer Abnahme unerwünschter Verbindungen führt (z.B. wenn die Modulation des Stoffwechsels von Lipiden und Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen zu Veränderungen der Ausbeute,
35 Produktion und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammensetzung der gewünschten Verbindungen innerhalb der Zellen führt, was wiederum die Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien beeinflussen kann). Aspekte der Erfindung sind nachstehend weiter erläutert.

40 I. Feinchemikalien und PUFAs

Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und umfasst Moleküle, die durch einen Organismus produziert worden sind und Anwendungen in verschiedenen Industrien finden, wie,
45 aber nicht beschränkt auf, die pharmazeutische, Landwirtschafts-, Nahrungsmittel- und Kosmetik-Industrie. Diese Verbindungen umfassen Lipide, Fettsäuren, Cofaktoren und Enzyme usw. (wie z.B.

19

beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsgb., VCH: Weinheim und darin enthaltenen Literaturstellen), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (z.B. Arachidonsäure), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, Vitamins, S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und darin enthaltenen Literaturstellen; und Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) Nutrition, Lipids, Health and Disease Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCs Press (1995)), Enzyme und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086, und darin angegebenen Literaturstellen beschriebenen Chemikalien. Der Stoffwechsel und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

Die Kombination verschiedener Vorläufermoleküle und Biosyntheseenzyme führt zur Herstellung verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine entscheidende Auswirkung auf die Zusammensetzung der Membran hat. Es kann angenommen werden, dass PUFAs nicht nur einfach in Triacylglycerin, sondern auch in Membranlipide eingebaut werden.

Die Synthese von Membranen ist ein gut charakterisierter Prozess, an dem eine Anzahl von Komponenten, einschließlich Lipiden als Teil der Bilayer-Membran, beteiligt sind. Die Produktion neuer Fettsäuren, wie PUFAs, kann daher neue Eigenschaften von Membranfunktionen innerhalb einer Zelle oder eines Organismus erzeugen.

Zellmembranen dienen einer Vielzahl von Funktionen in einer Zelle. Zuerst und in erster Linie grenzt eine Membran den Inhalt einer Zelle von der Umgebung ab, wodurch sie der Zelle Integrität verleiht. Membranen können auch als Schranken gegenüber dem Einstrom gefährlicher oder unerwünschter Verbindungen und auch gegenüber dem Ausstrom gewünschter Verbindungen dienen.

Detailliertere Beschreibungen und Beteiligungen von Membranen und die beteiligten Mechanismen siehe in: Bamberg, E., et al. (1993) Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes, Q. Rev. Biophys. 26:1-25; Gennis, R.B. (1989) Pores, Channels and Transporters, in: Biomembranes, Molecular Structure and Function, Springer: Heidelberg, S. 270-322; und Nikaido, H., und Saier, H. (1992) Transport proteins in bacteria: common themes in their design, Science 258:936-942, und den in jeder dieser Literaturstellen enthaltenen Zitaten.

20

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, 5 umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA entweder in Malonyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase. Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle 10 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* 20 *Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, und die enthaltene Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993) *Microbiological Reviews* 57:522-542 und die enthaltene Literaturstellen).

Vorläufer für die PUFA-Biosynthese sind beispielsweise 25 Palmitoleinsäure, Linol- und Linolensäure. Diese C₁₆- und/oder C₁₈-Kohlenstoff-Fettsäuren müssen auf C₂₀ und C₂₂ verlängert werden, damit Fettsäuren vom Eicosa- und Docosa-Kettentyp erhalten werden. Dieses Elongieren erfolgt vorteilhaft mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren bzw. mit den durch diese 30 Nukleinsäuren kodierten Proteine. Mit Hilfe verschiedener Desaturasen, wie Enzymen, welche Δ-6-Desaturase-, Δ-5- und Δ-4-Desaturaseaktivität aufweisen, können Arachidonsäure, Eicosa-pentensäure und Docosahexaensäure sowie verschiedene andere langkettige PUFAs erhalten, extrahiert und für verschiedene Zwecke 35 bei Nahrungsmittel-, Futter-, Kosmetik- oder pharmazeutischen Anwendungen verwendet werden.

Zur Herstellung langkettiger PUFAs müssen, wie oben erwähnt, die mehrfach ungesättigten C₁₆- und/oder C₁₈-Fettsäuren um mindestens 40 zwei Kohlenstoffatome durch die Enzymaktivität einer Elongase verlängert werden. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen kodieren erste Pflanzen-Elongasen, die C₁₆- und/oder C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängern können. Nach einer 45 Elongationsrunde führt diese Enzymaktivität zu C₁₈- bzw. C₂₀-Fettsäuren, und nach zwei, drei und vier bzw. fünf Elongationsrunden zu C₂₂-, C₂₄- oder C₂₆-Fettsäuren. Mit den erfindungsgemäßen

21

Elongasen können auch längere PUFAs synthetisiert werden. Die Aktivität der erfindungsgemäßen Elongasen führt vorzugsweise zu C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei oder vier Doppelbin-

5 dungen, besonders bevorzugt drei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül. Nach der Elongation mit den erfindungsgemäßen Enzymen können weitere Desaturierungsschritte erfolgen. Daher führen die Produkte der Elongaseaktivität und der möglichen weiteren Desaturierung zu bevorzugten PUFAs mit höherem Desaturierungs-

10 grad, wie Docosadiensäure, Arachidonsäure, ω₆-Eicosatriendi-homo-γ-linolensäure, Eicosapentensäure, ω₃-Eicosatriensäure, ω₃-Eicosatetraensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure. Substrate dieser erfindungsgemäßen Enzymaktivität sind zum Bei-

15 spiel Taxolsäure, 6,9-Octadecadiensäure, Linolsäure, γ-Linolensäure, Pinolensäure, α-Linolensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure, γ-Linolensäure und/oder α-Linolensäure. Die C₁₆- und/oder C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsge-

20 mäßige Enzymaktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glykolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglycerin, Diacylglycerin oder Triacylglycerin, verlängert werden.

Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modi-

25 fikationen 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).

30 Weiterhin ändert sich durch die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in den verschiedenen Wirtsorganismen nicht nur die Zusammensetzung der Membranlipide insgesamt, sondern es verändert sich die Zusammensetzung aller Verbindungen in der Wirtszelle,

35 die ungesättigte Fettsäuren enthalten, gegenüber den ursprünglichen Wirtszellen, die die Nukleinsäuren nicht oder nicht in diesen Mengen enthalten. Diese Veränderungen sind bei Wirtsorganismen beispielsweise Pflanzenzellen ausgeprägter, die die durch die Nukleinsäuren kodierte Proteine bzw. Enzyme natür-

40 licherweise nicht enthalten. Durch die Expression der Nukleinsäuren entstehen dadurch neue Lipidzusammensetzungen, die ein weiterer Aspekt der Erfindung sind.

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

22

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

15

Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika, wie 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. Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die sie produzieren können, wie in Bakterien, ist im großen und ganzen charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996; Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E., & Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research Asia, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).

Die oben erwähnten Moleküle sind entweder selbst biologisch aktive Moleküle oder Vorstufen biologisch aktiver Substanzen, die entweder als Elektronenüberträger oder Zwischenprodukte bei einer Vielzahl von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungshilfsstoffe. (Einen Überblick über Struktur, Aktivität und industrielle Anwendungen dieser Verbindungen siehe z.B. in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren haben verschiedene Funktionen und gesundheitsfördernde Wirkungen, beispielsweise bei koronarer Herzerkrankung, Entzündungsmechanismen, Kinderernährung usw. Veröffentlichungen und Literaturstellen, einschließlich darin zitierter Literatur-

stellen, siehe in: Simopoulos, 1999, Am. J. Clin. Nutr. 70 (3. Suppl.):560-569, Takahata et al., Biosc. Biotechnol. Biochem. 1998, 62(11):2079-2085, Willich und Winther, 1995, Deutsche Medizinische Wochenschrift 120(7):229ff. Sie sind außerdem
5 wichtige Ausgangsstoffe für die Synthese von Verbindungen, die wichtige biologische Vorgänge innerhalb des Organismus steuern. Sie finden deshalb beispielsweise in verschiedenen diätischen Lebensmitteln oder Medikamenten Anwendung.

10 II. Elemente und Verfahren der Erfindung

Die vorliegende Erfindung beruht zumindest teilweise auf der Entdeckung eines neuen Moleküls, das hier als PSE-Nukleinsäure- und -Proteinmoleküle bezeichnet wird, welche eine Wirkung auf
15 die Produktion von Zellmembranen oder Fettsäuren wie in *Physcomitrella patens*, *Ceratodon purpureus* und/oder *Phytophthora infestans* ausüben und beispielsweise die Bewegung von Molekülen über diese Membranen beeinflussen. Bei einer Ausführungsform nehmen die PSE-Moleküle am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zell-
20 membran und/oder Fettsäuren in Organismen, wie Mikroorganismen und Pflanzen, notwendigen Verbindungen teil oder beeinflussen indirekt den Transport von Molekülen über diese Membranen. Bei einer bevorzugten Ausführungsform hat die Aktivität der erfindungsgemäßen PSE-Moleküle zur Regulation der Produktion von
25 Membrankomponenten und des Membrantransports eine Auswirkung auf die Produktion der gewünschten Feinchemikalie durch diesen Organismus. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Aktivität der erfindungsgemäßen PSE-Moleküle moduliert, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion
30 der Stoffwechselwege von Mikroorganismen oder Pflanzen, welche die erfindungsgemäßen PSEs regulieren, moduliert sind und die Effizienz des Transport von Verbindungen durch die Membranen verändert ist, was entweder direkt oder indirekt die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten
35 Feinchemikalie durch Mikroorganismen und Pflanzen moduliert.

Der Begriff PSE oder PSE-Polypeptid umfasst Proteine, die am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Organismen, wie Mikroorganismen und Pflanzen, notwendigen Verbindungen oder
40 am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen. Beispiele für PSEs sind in der SEQ ID NO:1 oder ihren Homologa, Derivaten oder Analoga offenbart. Die Begriffe PSE oder PSE-Nukleinsäuresequenz(en) umfassen Nukleinsäuresequenzen, die eine PSE kodieren und bei denen ein Teil eine kodierende Region
45 und ebenfalls entsprechende 5'- und 3'-untranslatierte Sequenzbereiche ist. Beispiele für PSE-Gene sind die in SEQ ID NO:1 dargestellten. Die Begriffe Produktion oder Produktivität sind

24

im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Konzentration des Fermentationsproduktes (zum Beispiel der gewünschten Feinchemikalie), das in einer bestimmten Zeitspanne und einem bestimmten Fermentationsvolumen gebildet wird (z.B. kg Produkt pro Stunde pro Liter). Der Begriff Effizienz der Produktion umfasst die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten Produktionsmenge nötig ist (z.B. wie lange die Zelle zur Aufrichtung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff Ausbeute oder Produkt/Kohlenstoff-Ausbeute ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d.h. die Feinchemikalie). Dies wird gewöhnlich beispielsweise ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Erhöhen der Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewonnenen Moleküle oder der geeigneten gewonnenen Moleküle dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe Biosynthese oder Biosyntheseweg sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle aus Zwischenverbindungen, beispielsweise in einem Mehrschritt- und/oder 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/oder 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.

Bei einer anderen Ausführungsform können die erfindungsgemäßen PSE-Moleküle die Produktion eines gewünschten Moleküls, wie einer Feinchemikalie, in einem Mikroorganismus oder in Pflanzen modulieren. Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung einer erfindungsgemäßen PSR die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einem Mikroorganismus- oder Pflanzenstamm, die dieses veränderte Protein enthalten, direkt beeinflussen kann. Die Anzahl oder Aktivität von PSEs, die am Transport von Feinchemikalienmolekülen innerhalb oder aus der Zelle beteiligt sind, kann erhöht werden, so dass größere Mengen dieser Verbindungen über Membranen transportiert werden, aus denen sie leichter gewonnen und ineinander umgewandelt werden. Ferner sind Fettsäuren, Triacylglycerine und/oder Lipide selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch

25

- Optimierung der Aktivität oder Steigern der Anzahl einer oder mehrerer erfindungsgemäßer PSEs, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Stören der Aktivität einer oder mehrerer PSEs, die am Abbau dieser Verbindungen
- 5 beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Organismen, wie Mikroorganismen oder Pflanzen, zu erhöhen.
- 10 Die Mutagenese der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren bzw. PSE-Gene kann auch PSEs mit veränderten Aktivitäten hervorbringen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien aus Mikroorganismen oder Pflanzen indirekt beeinflussen. Beispielsweise können erfindungsgemäße PSEs, die am Export von
- 15 Abfallprodukten beteiligt sind, eine größere Anzahl oder höhere Aktivität aufweisen, so dass die normalen Stoffwechselabfälle der Zelle (deren Menge möglicherweise aufgrund der Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie erhöht ist) effizient exportiert werden, bevor sie die Moleküle in der Zelle schädigen können (was
- 20 die Lebensfähigkeit der Zelle herabsetzen würde) oder die Feinchemikalien-Biosynthesewege stören können (was die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie senken würde). Die relativ großen intrazellulären Mengen der gewünschten Feinchemikalie selbst können ferner für
- 25 die Zelle toxisch sein, so dass man durch Steigern der Aktivität oder Anzahl von Transportern, die diese Verbindungen aus der Zelle exportieren können, die Lebensfähigkeit der Zelle in Kultur steigern kann, was wiederum zu einer größeren Anzahl an Zellen in der Kultur führt, welche die gewünschte Feinchemikalie produ-
- 30 zieren. Die erfindungsgemäßen PSEs können auch so manipuliert werden, dass die entsprechenden Mengen unterschiedlicher Lipid- und Fettsäuremoleküle produziert werden. Dies kann eine erhebliche Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigen-
- 35 schaften aufweist, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran sowie die Integrität der Zelle beeinflussen, was jeweils eine erhebliche Auswirkung auf die
- 40 Produktion von Feinchemikalien aus Mikroorganismen und Pflanzen in Fermentationskultur im großen Maßstab hat. Pflanzenmembranen verleihen spezifische Eigenschaften, wie Toleranz gegenüber Wärme, Kälte, Salz, Trockenheit sowie Toleranz gegen Pathogene, wie Bakterien und Pilze. Daher kann die Modulation der Membran-
- 45 komponenten eine grundlegende Wirkung auf die Überlebensfähigkeit der Pflanzen unter den oben genannten Stressparametern haben. Dies kann über Änderungen in Signalkaskaden oder direkt über die

veränderte Membranzusammensetzung erfolgen (siehe zum Beispiel: Chapman, 1998, Trends in Plant Science, 3(11):419-426) und Signalkaskaden (siehe Wang 1999, Plant Physiology, 120:645-651) oder die Kältetoleranz, wie offenbart in WO 95/18222, beeinflussen.

Die erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuresequenzen sind im Genom eines *Phytophthora infestans*- Stamms enthalten, die beispielsweise über die Sammlungen wie ATCC oder DSM verfügbar sind. Die Nukleotidsequenz der isolierten *Physcomitrella patens*-cDNA und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *Phytophthora infestans* -PSEs sind in den SEQ ID NO:1 bzw. 2 gezeigt. Es wurden Computeranalysen durchgeführt, die diese Nukleotidsequenzen als Sequenzen klassifizierten und/oder identifizierten, die am Stoffwechsel von Zellmembrankomponenten beteiligte Proteine oder am Transport von Verbindungen über Zellmembranen bzw. Fettsäuren beteiligte Proteine kodieren. Ein EST mit der Datenbankeingabe-Nr. 08_ck19_b07 des Erfinders ist Teil der gezeigten Sequenz in SEQ ID NO:1. Inzwischen wurden diese ESTs umbenannt, was zu dem überarbeiteten Namen: pp001019019f führte. Auf analoge Weise wurde das partielle Polypeptid als pp001019019f bezeichnet. Das vollständige Fragment-Insert des ESTs pp001019019f wurde sequenziert und ergab die SEQ ID NO:1, welche die vollständige Sequenz von pp001019019f zeigt. Sie enthält eine vollständigen, funktionell aktiven Klon, von dem sich nach spezifischer Expression in Hefe herausstellte, dass er die gewünschte Substratspezifität aufwies, wie im Beispielteil gezeigt ist. Auch Hefen sind geeignete erfindungsgemäße Organismen, beispielsweise als Wirtszellen für die erfindungsgemäßen Gene, Genkonstrukte oder Vektoren.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Proteine mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog (= identisch) zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 ist. Wie hier verwendet, ist ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz ist, zu mindestens etwa 50 % homolog zu der ausgewählten Aminosäuresequenz, z.B. der gesamten ausgewählten Aminosäuresequenz. Ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die im wesentlichen homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz ist, kann auch zu mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 % oder 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz sein.

27

Die erfindungsgemäße PSE oder der biologisch aktive Teil oder das Fragment davon kann am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen oder eine oder mehrere der zur Elongation von C₁₈-PUFAs benötigten Aktivitäten besitzen, so dass C₂₂- oder C₂₄-PUFAs sowie verwandte PUFAs erhalten werden.

Verschiedene Aspekte der Erfindung sind eingehender in den 10 folgenden Unterabschnitten beschrieben.

A. Isolierte Nukleinsäuremoleküle

Eine Ausführungsform der Erfindung ist eine isolierte Nukleinsäure, die von einem Oomyzet stammt und ein Polypeptid kodiert, das C₁₆- und/oder C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert.

20 Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist eine isolierte Nukleinsäure, umfassend eine Nukleotidsequenz, die ein Polypeptid kodiert, das C₁₆- und/oder C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure verlängert, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus

25

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

b) einer Nukleinsäuresequenz, die gemäß dem degenerierten genetischen Code von der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz stammt,

30

c) Derivate der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, die Polypeptide mit mindestens 50 % Homologie zu der Sequenz kodiert, die die Aminosäuresequenzen in SEQ ID NO:2 kodiert, wobei die Sequenz als C₁₆- oder C₁₈-Elongase wirkt.

35

Die oben genannte erfindungsgemäße Nukleinsäure stammt von Organismen, wie Ciliaten, Pilzen, Algen oder Dinoflagellaten, die PUFAs synthetisieren können, vorzugsweise von Pflanzen oder Pilzen, besonders bevorzugt aus der Gattung *Phytophthora* und am stärksten bevorzugt von *Phytophthora infestans*.

Ein Aspekt der Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäuremoleküle, die PSE-Polypeptide oder biologisch aktive Teile davon kodieren, sowie Nukleinsäurefragmente, die zur Verwendung als Hybridisierungs sonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung einer PSE-kodierenden Nukleinsäure (z.B. PSE-DNA) aus-

reichen. Der Begriff "Nukleinsäuremolekül", wie hier verwendet, soll einzelsträngige oder doppelsträngige DNA-Moleküle (z.B. cDNA oder genomische DNA) und/oder RNA-Moleküle (z.B. mRNA) sowie DNA- oder RNA-Analoga, die mittels Nukleotidanaloga erzeugt werden, oder DNA/RNA-Hybride umfassen. Dieser Begriff umfasst zudem die am 3'- und am 5'-Ende des kodierenden Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens etwa 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des kodierenden Bereichs und mindestens etwa 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des kodierenden Genbereichs. Das Nukleinsäuremolekül kann einzelsträngig oder doppelsträngig sein, ist aber vorzugsweise doppelsträngige DNA. 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 PSE-Nukleinsäuremolekül zum Beispiel weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb an Nukleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt (z.B. eine *Physcomitrella patens*-Zelle) flankieren. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül, wie ein cDNA-Molekül, kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

30

Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, z.B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 oder eines Teils davon, kann unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Beispielsweise kann eine *Phytophthora infestans*-cDNA aus einer *P. infestans*-Bank isoliert werden, indem die vollständige SEQ ID NO:1 oder ein Teil davon 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) verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz der SEQ ID NO:1 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz oder von Teilen davon, insbesondere Regionen um His-Box-Motive, siehe Shanklin et al. (1994) *Biochemistry* 33, 12787-12794, erstellt

45

29

wurden, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die vollständigen Sequenz der SEQ ID NO:1 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser
5 gleichen Sequenz der SEQ ID NO:1 erstellt worden sind). Zum Beispiel lässt sich mRNA aus Oomyzetenzellen 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
10 von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL) herstellen. Synthetische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion lassen sich auf der Basis einer der in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen erstellen. Eine
15 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-Sequenz-
20 analyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer PSE-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, beispielsweise mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

25 Die in SEQ ID NO:1 gezeigte cDNA umfasst Sequenzen, die PSEs kodieren, (d.h. den "kodierenden Bereich") sowie 5'-untranslatierte Sequenzen und 3'-untranslatierte Sequenzen. Alternativ kann das Nukleinsäuremolekül nur den kodierenden Bereich einer der Sequenzen in SEQ ID NO:1 umfassen oder kann ganze genomische
30 Fragmente, die aus genomischer DNA isoliert sind, enthalten.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül ein Nukleinsäuremolekül, das ein Komplement einer der in SEQ ID NO:1
35 gezeigten Nukleotidsequenzen oder eines Teils davon ist. Ein Nukleinsäuremolekül, das zu einer der in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen komplementär ist, ist eines, das zu einer der in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen ausreichend
40 komplementär ist, dass es mit einer der in SEQ ID NO:1 angegebenen Sequenzen hybridisieren kann, wodurch ein stabiler Duplex entsteht.

Homologa der neuen Elongase-Nukleinsäuresequenz mit der Sequenz
45 SEQ ID NO:1 bedeutet beispielsweise allelische Varianten mit mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis

30

90 % oder 90 bis 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie zu einer in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen oder ihren Homologa, Derivaten oder Analoga oder Teilen davon, wobei Homologie im
5 Sinne der Erfindung Identität bedeutet. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst ein isoliertes erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die an eine der in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen oder einen Teil davon hybridisiert, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
10 Allelische Varianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus/in der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz erhalten lassen, wobei aber die Absicht ist, dass die Enzymaktivität der davon herrührenden synthetisierten Proteine für die
15 Insertion eines oder mehrerer Gene vorteilhafterweise beibehalten wird. Proteine, die noch die enzymatische Aktivität der Elongase besitzen, bedeutet Proteine mit mindestens 10 %, vorzugsweise 20 %, besonders bevorzugt 30 %, ganz besonders bevorzugt 40 % der ursprünglichen Enzymaktivität, verglichen mit dem durch
20 SEQ ID NO: 2 kodierten Protein.

Homologa der SEQ ID NO:1 bedeutet beispielsweise auch bakterielle, Pilz- und Pflanzenhomologa, verkürzte Sequenzen, einzelsträngige DNA oder RNA der kodierenden und nicht-
25 kodierenden DNA-Sequenz.

Homologa der SEQ ID NO:1 bedeutet auch Derivate, wie beispielsweise Promotorvarianten. Die Promotoren stromaufwärts der angegebenen Nukleotidsequenzen können durch einen oder mehrere
30 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
35 Promotoren, sogar aus heterologen Organismen, ersetzt werden.

Überdies kann das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül nur einen Teil des kodierenden Bereichs einer der Sequenzen in SEQ ID NO:1 umfassen, zum Beispiel ein Fragment, das als Sonde oder Primer
40 verwendet werden kann, oder ein Fragment, welches einen biologisch aktiven Abschnitt einer PSE kodiert. Die aus der Klonierung des PSE-Gens von *P. infestans* ermittelten Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von PSE-Homologa in
45 anderen Zelltypen und Organismen sowie PSE-Homologa aus anderen Oomyzeten oder verwandten Arten gestaltet sind. Die Sonde/der Primer umfasst gewöhnlich im wesentlichen gereinigtes Oligo-

31

nukleotid. Das Oligonukleotid umfasst gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise etwa 16, stärker bevorzugt etwa 25, 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges
5 einer der in SEQ ID NO:1 angegebenen Sequenzen, eines Antisense-Stranges einer der in SEQ ID NO:1 angegebenen Sequenzen oder seiner Homologa, Derivate oder Analoga oder natürlich vorkommender Mutanten davon hybridisiert. Primer auf der Basis einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 können in PCR-Reaktionen zur
10 Klonierung von PSE-Homologa verwendet werden. Sonden auf der Basis der PSE-Nukleotidsequenzen können zum Nachweis von Transkripten oder genomischen Sequenzen, die das gleiche oder homologe Proteine kodieren, verwendet werden. Bei bevorzugten Ausführungsformen umfasst die Sonde zudem eine daran gebundene Markierungs-
15 gruppe, z.B. ein Radioisotop, eine fluoreszierende Verbindung, ein Enzym oder einen Enzym-Cofaktor. Diese Sonden können als Teil eines Test-Kits für genomische Marker zur Identifizierung von Zellen, die eine PSE misexprimieren, beispielsweise durch Messen einer Menge einer PSE-kodierenden Nukleinsäure in einer Zellen-
20 probe, z.B. Messen der PSE-mRNA-Spiegel, oder zur Bestimmung, ob ein genomisches PSE-Gen mutiert oder deletiert ist, verwendet werden.

Bei einer Ausführungsform kodieren die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle ein Protein oder einen Teil davon, das/der eine
25 Aminosäuresequenz umfasst, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 ist, dass das Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Ver-
30 bindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen oder an der Fettsäuresynthese teilzunehmen, beibehält. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "ausreichend homolog" Proteine oder Teile davon, deren Aminosäuresequenzen eine minimale Anzahl identischer oder äquivalenter Aminosäurereste (z.B. einen Amino-
35 säurerest mit einer ähnlichen Seitenkette, wie ein Aminosäurerest in einer der Sequenzen der SEQ ID NO:2) zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 aufweisen, so dass das Protein oder der Teil davon am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am
40 Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann. Proteinbestandteile dieser Stoffwechselwege für Membrankomponenten oder Membrantransportsysteme können, wie hier beschrieben, eine Rolle bei der Produktion und Sekretion einer oder mehrerer Feinchemikalien spielen. Beispiele für diese Aktivitäten sind
45 hier ebenfalls beschrieben. Somit trägt die "Funktion einer PSE" entweder direkt oder indirekt zur Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien bei.

32

Beispiele für PSE-Substratspezifitäten der katalytischen Aktivität sind in Tabelle I angegeben.

- Bei einer weiteren Ausführungsform kodieren Derivate des
- 5 erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls Proteine mit mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Homologie zu einer vollständigen
- 10 Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2. Die Homologie der Aminosäuresequenz wurde über den gesamten Sequenzbereich mit dem Programm PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5, 1989:151-153) bestimmt.
- 15 Teile von Proteinen, die von den erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäuremolekülen kodiert werden, sind vorzugsweise biologisch aktive Teile einer der PSEs. Wie hier verwendet, soll der Begriff "biologisch aktiver Teil einer PSE", einen Abschnitt, z.B. eine Domäne/ein Motiv, einer PSE umfassen, der am Stoffwechsel von zum
- 20 Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder an der Fettsäuresynthese beteiligt ist oder eine in Tabelle I angegebene Aktivität aufweist. Zur Bestimmung, ob eine PSE oder ein biologisch aktiver Teil davon am
- 25 Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in Mikroorganismen oder Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann, kann ein Test der enzymatischen Aktivität durchgeführt werden. Diese Testverfahren, wie eingehend in Beispiel 8 des Beispielteils beschrieben, sind
- 30 dem Fachmann geläufig.

- Zusätzliche Nukleinsäurefragmente, die biologisch aktive Abschnitte einer PSE kodieren, lassen sich durch Isolierung eines Teils der in SEQ ID NO:2 dargestellten Sequenz, Exprimieren
- 35 des kodierten Abschnitt der PSE oder des Peptids (z.B. durch rekombinante Expression in vitro) und Bestimmen der Aktivität des kodierten Teils der PSE oder des Peptids herstellen.

- Die Erfindung umfasst zudem Nukleinsäuremoleküle, die sich von
- 40 einer der in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen (und Teilen davon) aufgrund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden und somit die gleiche PSE kodieren wie diejenige, die von den in SEQ ID NO:1 gezeigten Nukleotidsequenzen kodiert wird. Bei einer anderen Ausführungsform hat ein erfindungsgemäßes isoliertes
- 45 Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die ein Protein mit einer in SEQ ID NO:2 gezeigten Aminosäuresequenz kodiert. Bei einer weiteren Ausführungsform kodiert das erfindungsgemäße

33

Nukleinsäuremolekül ein Vollängen- *Phytophthora infestans*-Protein, das zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 (die von einem in SEQ ID NO:1 gezeigten offenen Leseraster kodiert wird) im wesentlichen homolog ist.

5

Zusätzlich zu den in SEQ ID NO:1 gezeigten *Phytophthora infestans*-PSE-Nukleotidsequenzen erkennt der Fachmann, dass DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen in den Aminosäuresequenzen der PSEs führen, innerhalb einer Population (z.B. der *Phytophthora infestans*-Population) existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im PSE-Gen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund von natürlicher Variation existieren. Wie hier verwendet, bedeuten die Begriffe "Gen" und "rekombinantes Gen" Nukleinsäuremoleküle mit einem offenen Leserahmen, der eine PSE, vorzugsweise eine *Phytophthora infestans*-PSE, kodiert. Diese natürlichen Varianten bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz des PSE-Gens. Sämtliche und alle dieser Nukleotidvariationen und daraus resultierende Aminosäurepolymorphismen in PSE, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die funktionelle Aktivität von PSEs nicht verändern, sollen im Umfang der Erfindung enthalten sein.

Nukleinsäuremoleküle, die den natürlichen Varianten entsprechen, und nicht *Phytophthora infestans*-Homologa, -Derivate und -Analoge der erfindungsgemäßen *Phytophthora infestans*-PSE-cDNA können auf der Grundlage ihrer Homologie zu der hier offenbarten *Phytophthora infestans*-PSE-Nukleinsäure unter Verwendung der *Phytophthora infestans*-cDNA oder eines Teils davon als Hybridisierungssonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. Bei einer anderen Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 umfasst. Bei anderen Ausführungsformen ist die Nukleinsäure mindestens 25, 50, 100, 250 oder mehr Nukleotide lang. 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 Bei-

- spiel für stringente Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in 6 x Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/sodium citrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 50 bis 65°C.
- 5 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 10 42°C und 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis 5 x SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel im oben genannten Puffer vorliegt, zum Beispiel 50 % Formamid, ist die Temperatur unter Standardbedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind 15 die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x 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 x SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise zwischen 45°C und 55°C. Die vorstehend genannten Hybridisierungs- 20 temperaturen 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 25 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 30 University Press, Oxford, bestimmt werden können. Dem Fachmann ist bekannt, dass die Art und Zeit der Entwicklung der Hybridisierungsergebnisse einen Einfluss auf das Hybridisierungsergebnis hat. In einfachen Versuchen ist er in der Lage die Entwicklungsbedingungen so zu optimieren, dass die vorgenannte Hybridisierung 35 zuverlässige sichere Ergebnisse liefert.

- Vorzugsweise entspricht ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül, das unter stringenten Bedingungen an eine Sequenz der SEQ ID NO:1 hybridisiert, einem natürlich vorkommenden 40 Nukleinsäuremolekül. Wie hier verwendet, betrifft ein "natürlich vorkommendes" Nukleinsäuremolekül ein RNA- oder DNA-Molekül mit einer Nukleotidsequenz, die in der Natur vorkommt (z.B. ein natürliches Protein kodiert). Bei einer Ausführungsform kodiert die Nukleinsäure eine natürliche vorkommendes *Phytophthora* 45 *infestans* -PSE.

35

- Zusätzlich zu natürlich vorkommenden Varianten der PSE-Sequenz, die in der Population existieren können, erkennt der Fachmann ferner, dass auch Änderungen durch Mutation in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 eingebracht werden können, was zu
- 5 Änderungen der Aminosäuresequenz der kodierten PSE führt, ohne dass die Funktionsfähigkeit des PSE-Proteins beeinträchtigt wird. Beispielsweise lassen sich Nukleotidsusbtitutionen, die an "nicht-essentiellen" Aminosäureresten zu Aminosäuresubstitutionen führen, in einer Sequenz der SEQ ID NO:1 herstellen. Ein "nicht-
- 10 essentieller" Aminosäurerest ist ein Rest, der sich in einer Wildtypsequenz einer der PSEs (SEQ ID NO:2) verändern lässt, ohne dass die Aktivität der PSE verändert wird, wohingegen ein "essentieller" Aminosäurerest für die PSE-Aktivität erforderlich ist. Andere Aminosäurereste (z.B. diejenigen, die in der
- 15 Domäne mit PSE-Aktivität nicht konserviert oder lediglich semi-konserviert sind) können jedoch für die Aktivität nicht essentiell sein und lassen sich somit wahrscheinlich verändern, ohne dass die PSE-Aktivität verändert wird.
- 20 Folglich betrifft in weiterer Aspekt der Erfindung Nukleinsäuremoleküle, die PSEs kodieren, die veränderte Aminosäurereste enthalten, die für die PSE-Aktivität nicht essentiell sind. Diese PSEs unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz von einer Sequenz in SEQ ID NO:2 und behalten dennoch zumindest eine der
- 25 hier beschriebenen PSE-Aktivitäten. Das isolierte Nukleinsäuremolekül umfasst bei einer Ausführungsform eine Nukleotidsequenz, die ein Protein kodiert, wobei das Protein eine Aminosäuresequenz mit mindestens etwa 50 % Homologie zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 umfasst und am Stoffwechsel von zum Aufbau von
- 30 Zellmembranen in *Phytophthora infestans* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder am Fettsäurestoffwechsel beteiligt ist oder eine oder mehrere der in Tabelle I aufgeführten Aktivitäten besitzt. Das von dem Nukleinsäuremolekül kodierte Protein ist vorzugsweise
- 35 mindestens etwa 50 bis 60 % homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO:2, stärker bevorzugt mindestens etwa 60 bis 70 % homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO:2, noch stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO:2 und am stärksten bevorzugt
- 40 mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 % oder 99 % homolog zu einer der Sequenzen in SEQ ID NO:2.

Zur Bestimmung der prozentualen Homologie von zwei Aminosäuresequenzen (z.B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO:2 und einer

45 mutierten Form davon) oder von zwei Nukleinsäuren werden die Sequenzen zum Zweck des optimalen Vergleichs untereinander geschrieben (z.B. können Lücken in die Sequenz eines Proteins

36

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
5 verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz (z.B. einer der Sequenzen der SEQ ID NO:2) durch den gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nukleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz (z.B. einer mutierten Form der aus SEQ ID NO:2 ausgewählten Sequenz) belegt wird, dann sind die Moleküle an dieser
10 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
15 identischen Positionen/Gesamtanzahl der Positionen x 100).

Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine PSE kodiert, die zu einer Proteinsequenz der SEQ ID NO:2 homolog ist, kann durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen
20 oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 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 durch Standardtechniken, wie stellenspezifische (= site directed)
25 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
30 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,
40 Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einer PSE 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
45 einen Teil der PSE-kodierenden Sequenz eingebracht werden, z.B. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können nach der hier beschriebenen PSE-Aktivität durchmustert

werden, um Mutanten zu identifizieren, die PSE-Aktivität beibehalten. Nach der Mutagenese einer der Sequenzen der SEQ ID NO:1 kann das kodierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann z.B. unter Verwendung der hier
5 beschriebenen Tests (siehe Beispielteil) bestimmt werden.

Zusätzlich zu den Nukleinsäuremolekülen, welche die vorstehend beschriebenen PSEs kodieren, betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle, die "Antisense" dazu
10 sind. Eine "Antisense"-Nukleinsäure umfasst eine Nukleotidsequenz, die zu einer "Sense"-Nukleinsäure, welche ein Protein kodiert, komplementär ist, z.B. komplementär zum kodierenden Strang eines doppelsträngigen cDNA-Moleküls oder komplementär zu einer mRNA-Sequenz. Eine Antisense-Nukleinsäure kann folglich
15 über Wasserstoffbrückenbindungen an eine Sense-Nukleinsäure binden. Die Antisense-Nukleinsäure kann zu einem gesamten PSE-kodierenden Strang oder nur zu einem Teil davon komplementär sein. Bei einer Ausführungsform ist ein Antisense-Nukleinsäuremolekül "Antisense" zu einem "kodierenden Bereich" des kodieren-
20 den Strangs einer Nukleotidsequenz, die eine PSE kodiert. Der Begriff "kodierender Bereich" betrifft den Bereich der Nukleotidsequenz, der Codons umfasst, die in Aminosäurereste translatiert werden (z.B. den gesamten kodierenden Bereich, der mit dem Stop-codon beginnt und endet, d.h. dem letzten Codon vor dem Stop-
25 codon). Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Antisense-Nukleinsäuremolekül "Antisense" zu einem "nicht-kodierenden Bereich" des kodierenden Strangs einer Nukleotidsequenz, die PSE kodiert. Der Begriff "nicht-kodierender Bereich" betrifft 5'- und 3'-Sequenzen, die den kodierenden Bereich flankieren
30 und nicht in Aminosäuren translatiert werden (d.h. die man auch als 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche bezeichnet).

Unter Voraussetzung der hier offenbarten PSE-kodierenden Sequenzen des kodierenden Stranges (z.B. die in SEQ ID NO:1
35 dargestellten Sequenzen) können erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuren gemäß den Regeln der Watson-Crick-Basenpaarung gestaltet werden. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann komplementär zum gesamten kodierenden Bereich von PSE-mRNA sein, ist aber stärker bevorzugt ein Oligonukleotid, das nur zu einem Teil des
40 kodierenden oder nicht-kodierenden Bereichs von PSE-mRNA "Antisense" ist. Das Antisense-Oligonukleotid kann z.B. zu dem Bereich, der die Translationsstartstelle von PSE-mRNA umgibt, komplementär sein. Ein Antisense-Oligonukleotid kann z.B. etwa 5,
10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 und mehr Nukleotide lang
45 sein. Eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure kann unter Verwendung chemischer Synthese und enzymatischer Ligationsreaktionen mittels im Fachgebiet bekannter Verfahren konstruiert

werden. Eine Antisense-Nukleinsäure (z.B. ein Antisense-Oligonukleotid) kann z.B. chemisch synthetisiert werden, wobei natürlich vorkommende Nukleotide oder verschiedentlich modifizierte Nukleotide verwendet werden, die so gestaltet sind, dass sie

5 die biologische Stabilität der Moleküle erhöhen oder die physikalische Stabilität des zwischen der Antisense- und der Sense-Nukleinsäure gebildeten Duplexes erhöhen, beispielsweise können Phosphorthioat-Derivate und acridinsubstituierte Nukleotide verwendet werden. Beispiele für modifizierte Nukleotide, die zur

10 Erzeugung der Antisense-Nukleinsäure verwendet werden können, sind u.a. 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chloruracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, Beta-D-Galacto-

15 sylqueosin, Inosin, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, Beta-D-Mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil,

20 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentyladenin, Uracil-5-oxoessigsäure (v), Wybutoxosin, Pseudouracil, Queosin, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxoessigsäuremethylester, Uracil-5-oxoessigsäure (v), 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-

25 carboxypropyl)uracil, (acp3)w und 2,6-Diaminopurin. Die Antisense-Nukleinsäure kann alternativ biologisch unter Verwendung eines Expressionsvektors hergestellt werden, in den eine Nukleinsäure in Antisense-Richtung subkloniert worden ist (d.h. RNA, die von der eingebrachten Nukleinsäure transkribiert wird,

30 ist zu einer Zielnukleinsäure von Interesse in Antisense-Richtung orientiert, was im nachstehenden Unterabschnitt weiter beschrieben ist).

Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuremoleküle werden

35 üblicherweise an eine Zelle verabreicht oder in situ erzeugt, so dass sie mit der zellulären mRNA und/oder der genomischen DNA, die eine PSE kodiert, hybridisieren oder daran binden, um dadurch die Expression des Proteins, z.B. durch Hemmung der Transkription und/oder Translation, zu hemmen. Die Hybridisierung kann durch

40 herkömmliche Nukleotidkomplementarität unter Bildung eines stabilen Duplexes oder z.B. im Fall eines Antisense-Nukleinsäuremoleküls, das DNA-Duplices bindet, durch spezifische Wechselwirkungen in der großen Furche der Doppelhelix erfolgen. Das Antisense-Molekül kann so modifiziert sein, dass es spezifisch an

45 einen Rezeptor oder an ein auf einer ausgewählten Zelloberfläche exprimiertes Antigen bindet, z.B. durch Binden des Antisense-Nukleinsäuremoleküls an ein Peptid oder einen Antikörper, das/der

39

- an einen Zelloberflächenrezeptor oder ein Antigen bindet. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann auch unter Verwendung der hier beschriebenen Vektoren den Zellen zugeführt werden. Zur Erzielung ausreichender intrazellulärer Konzentrationen der Antisense-Moleküle sind Vektorkonstrukte, in denen sich das Antisense-Nukleinsäuremolekül unter der Kontrolle eines starken prokaryotischen, viralen oder eukaryotischen, einschließlich pflanzlichen, Promotors befindet, bevorzugt.
- 10 Bei einer weiteren Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuremolekül ein α -anomerer Nukleinsäuremolekül. Ein α -anomerer Nukleinsäuremolekül bildet spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA, wobei die Stränge im Gegensatz zu gewöhnlichen β -Einheiten parallel zueinander verlaufen. (Gaultier et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6625-6641). Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann zudem ein 2'-O-Methylribonukleotid (Inoue et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) oder ein chimäres RNA-DNA-Analogon (Inoue et al. (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330) umfassen.
- 20 Bei einer weiteren Ausführungsform ist eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure ein Ribozym. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle mit Ribonukleaseaktivität, die eine einzelsträngige Nukleinsäure, wie eine mRNA, spalten können, zu der sie einen komplementären Bereich haben. Somit können Ribozyme (z.B. Hammerhead-Ribozyme (beschrieben in Haselhoff und Gerlach (1988) *Nature* 334:585-591)) zur katalytischen Spaltung von PSE-mRNA-Transkripten verwendet werden, um dadurch die Translation von PSE-mRNA zu hemmen. Ein Ribozym mit Spezifität für eine PSE-kodierende Nukleinsäure kann auf der Basis der Nukleotidsequenz einer hier offenbarten PSE-cDNA (d.h. 38_ck21_g07fwd in SEQ ID NO:1) oder auf der Basis einer gemäß den in dieser Erfindung gelehrt Verfahren zu isolierenden heterologen Sequenz gestaltet werden. Beispielsweise kann ein Derivat einer Tetrahymena-L-19-IVS-RNA konstruiert werden, wobei die Nukleotidsequenz der aktiven Stelle komplementär zu der Nukleotidsequenz ist, die in einer PSE-kodierenden mRNA gespalten werden soll. Siehe z.B. Cech et al., US-Patent Nr. 4,987,071 und Cech et al., US-Patent Nr. 5,116,742. Alternativ kann PSE-mRNA zur Selektion einer katalytischen RNA mit einer spezifischen Ribonukleaseaktivität aus einem Pool von RNA-Molekülen verwendet werden. Siehe z.B. Bartel, D., und Szostak, J.W. (1993) *Science* 261:1411-1418.
- 45 Alternativ lässt sich die PSE-Gen-Expression hemmen, indem Nukleotidsequenzen, die komplementär zum regulatorischen Bereich einer PSE-Nukleotidsequenz (z.B. einem PSE-Promotor

und/oder -Enhancer) sind, so dirigiert werden, dass Dreifach-helix-Strukturen gebildet werden, welche die Transkription eines PSE-Gens in Zielzellen hemmen. Siehe allgemein Helene, C. (1991) Anticancer Drug Res. 6(6) 569-84; Helene, C., et al. (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:27-36; und Maher, L.J. (1992) Bioassays 14(12):807-815.

In einer weiteren Alternative lässt sich die PSE-Gen-Expression durch Co-Suppression hemmen, auch eine gleichzeitige Expression eines kombinierten Antisense/Sense-Strang (RNAi-Technik) ist vorteilhaft möglich.

B. Genkonstrukt

15 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist ein neues Genkonstrukt, was eine isolierte Nukleinsäure bedeutet, die von einer Pflanze oder einem Pilz stammt und ein Polypeptid kodiert, das C₁₆- und/oder C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert, oder die Gensequenz der SEQ ID NO:1, ihre Homologa, Derivate oder Analoga, die funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulations-
20 signalen, vorteilhafterweise zur Steigerung der Genexpression, verbunden sind. Beispiele für diese Regulationssequenzen sind Sequenzen, an die Induktoren oder Repressoren binden und so die
25 Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und, wenn geeignet, genetisch modifiziert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet worden ist und
30 die Expression der Gene gesteigert worden ist. Das Genkonstrukt kann jedoch auch eine einfachere Struktur haben, d.h. dass keine zusätzlichen Regulationssignale vor der Sequenz SEQ ID NO:1 oder ihren Homologa inseriert worden sind und der natürliche Promotor mit seiner Regulation nicht deletiert worden ist. Statt dessen
35 ist die natürliche Regulationssequenz so mutiert worden, dass keine Regulation mehr stattfindet und die Genexpression verstärkt ist. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte Enhancer-Sequenzen, die funktionsfähig mit dem Promotor verbunden sind und die gesteigerte Expression der
40 Nukleinsäuresequenz ermöglichen, umfassen. Es ist auch möglich, am 3'-Ende der DNA-Sequenzen zusätzlich vorteilhafte Sequenzen zu inserieren, beispielsweise weitere Regulationselemente oder Terminatoren. Die Elongasegene können im Genkonstrukt in einer oder mehreren Kopien vorliegen. Es ist vorteilhaft für die
45 Insertion weiterer Gene in Organismen, wenn weitere Gene im Genkonstrukt vorliegen.

41

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das neue Verfahren liegen beispielsweise in Promotoren vor, wie dem *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacI^q-*, *T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *SP6-*, λ -*P_R*- oder λ -*P_L*-Promotor und werden vorteilhafterweise
5 in Gram-negativen Bakterien angewendet. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen liegen beispielsweise in den Gram-positiven Promotoren *amy* und *SPO2*, in den Hefe- oder Pilzpromotoren *ADC1*, *MFA*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* oder in den Pflanzenpromotoren *CaMV/35S* [Franck et al., *Cell* 21 (1980) 285-294], *PRP1*
10 [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., Tetra-
15 cyclin-induzierbar), EP-A-0 335 528 (Abzisin säure-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
20 Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase-Promotor aus *Glycine max* (Genbank-Zugangsnr. U87999) oder der in EP-A-0 249 676 beschriebene nodenspezifische Promotor. Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, welche die Expression in Geweben ermöglichen, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind. Ganz
25 besonders vorteilhaft sind samenspezifische Promotoren, wie der *usp-*, *LEB4-*, Phaseolin- oder Napin-Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promotoren, die für Monokotyledonen oder Dikotyledonen verwendet werden können und in US 5,608,152 (Napin-Promotor aus Raps), WO 98/45461 (Phaseolin-
30 Promotor aus *Arobidopsis*), US 5,504,200 (Phaseolin-Promotor aus *Phaseolus vulgaris*), WO 91/13980 (*Bce4*-Promotor aus Brassica), von Baeumlein et al., *Plant J.*, 2, 2, 1992:233-239 (*LEB4*-Promotor aus Leguminosen) beschrieben sind, wobei sich diese Promotoren für Dikotyledonen eignen. Die folgenden Promotoren eignen sich
35 beispielsweise für Monokotyledonen *lpt-2-* oder *lpt-1*-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230), Hordein-Promotor aus und andere, in WO 99/16890 beschriebene geeignete Promotoren.

Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren
40 Regulationssequenzen, wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft, zusätzlich synthetische Promotoren zu verwenden.

Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene
45 umfassen, die in die Organismen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und vorteilhaft, in die Wirtsorganismen Regulationsgene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch

ihre Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und darin zu exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein. Die inserierten Gene können ihren eigenen Promotor haben oder auch unter der Kontrolle des Promotors der Sequenz SEQ ID NO:1 oder seiner Homologa stehen.

Das Genkonstrukt umfasst vorteilhafterweise zur Expression der anderen vorliegenden Gene weitere 3'- und/oder 5'-terminale Regulationssequenzen zur Steigerung der Expression, die in Abhängigkeit vom gewählten Wirtsorganismus und dem Gen oder den Genen für die optimale Expression ausgewählt werden.

Diese Regulationssequenzen sollen, wie oben erwähnt, die spezifische Expression der Gene und die Proteinexpression ermöglichen. Dies kann je nach dem Wirtsorganismus beispielsweise bedeuten, dass das Gen nur nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die Regulationssequenzen oder -faktoren können außerdem vorzugsweise eine vorteilhafte Wirkung auf die Expression der eingebrachten Gene haben und diese somit steigern. Auf diese Weise ist es möglich, dass die Regulationselemente unter Verwendung starker Transkriptionssignale, wie Promotoren und/oder Enhancer, vorteilhafterweise auf Transkriptionsebene verstärkt werden. Es ist jedoch weiterhin auch möglich, die Translation zum Beispiel durch Verbesserung der mRNA-Stabilität zu verstärken.

30 C. Rekombinante Expressionsvektoren und Wirtszellen

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, die eine Nukleinsäure enthalten, die eine PSE (oder einen Teil davon) kodieren. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, 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 und episomale Säugervektoren). Andere Vektoren (z.B. nicht-episomale Säugervektoren) werden beim Einbringen in die Wirtszelle in das Genom einer Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert.

43

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
5 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 (z.B. replikations-
10 defiziente Retroviren, Adenoviren und adenoverwandte Viren), die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen. Ferner soll der Begriff Vektor auch andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wie Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare
15 oder zirkuläre DNA, umfassen.

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren umfassen eine erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein erfindungsgemäßes Genkonstrukt in einer Form, die sich zur Expression der Nukleinsäure in einer Wirtszelle eignet, was bedeutet, dass die
20 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
30 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)
35 umfassen. Diese Regulationssequenzen sind z.B. beschrieben in Goedel: 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,
40 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
45 Bedingungen steuern. Der Fachmann weiß, dass die Gestaltung des Expressionsvektors von Faktoren, wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des

44

gewünschten Proteins usw., abhängen kann. Die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren können in Wirtszellen eingebracht werden, um dadurch Proteine oder Peptide, einschließlich Fusionsproteinen oder -peptiden, herzustellen, die von den Nukleinsäuren, wie hier 5 beschrieben, kodiert werden (z.B. PSEs, mutante Formen von PSEs, Fusionsproteine usw.).

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von PSEs in prokaryotischen oder eukaryotischen 10 Zellen gestaltet sein. Beispielsweise können PSE-Gene in bakteriellen Zellen, wie *C. glutamicum*, 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 15 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 20 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), Ciliaten der Typen: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctoria, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucocystis, 25 Platyophrya, Potomacus, Pseudocohnilembus, Euplotes, Engelmaniella und Stylonychia, insbesondere der Gattung *Stylonychia lemnae*, mit Vektoren nach einem Transformationsverfahren, wie beschrieben in WO 98/01572, sowie Zellen vielzelliger Pflanzen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency 30 *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, 35 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)) oder nicht-humanen Säugerzellen exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden ferner erörtert in Goeddel, *Gene 40 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.

45

Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, welche die Expression von Fusions- oder nicht-Fusionsproteinen steuern. Fusionsvektoren fügen eine Reihe von Aminosäuren an ein darin kodiertes Protein an, gewöhnlich am Amino-terminus des rekombinanten Proteins, aber auch am C-Terminus oder fusioniert innerhalb geeigneter Bereiche in den Proteinen. Diese Fusionsvektoren haben gewöhnlich drei Aufgaben: 1) die Verstärkung der Expression von rekombinatem Protein; 2) die Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins und 3) die Unterstützung der Reinigung des rekombinanten Proteins durch Wirkung als Ligand bei der Affinitätsreinigung. Bei Fusions-Expressionsvektoren wird oft eine proteolytische Spaltstelle an der Verbindungsstelle der Fusionseinheit und des rekombinanten Proteins eingebracht, so dass die Abtrennung des rekombinanten Proteins von der Fusionseinheit nach der Reinigung des Fusionsproteins möglich ist. Diese Enzyme und ihre entsprechenden Erkennungssequenzen umfassen Faktor Xa, Thrombin und Entero-kinase.

20

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. Bei einer Ausführungsform ist die PSE-kodierende Sequenz in einen pGEX-Expressionsvektor kloniert, so dass ein Vektor erzeugt wird, der ein Fusionsprotein kodiert, das vom N-Terminus zum C-Terminus GST-Thrombin-Spaltstelle-X-Protein umfasst. Das Fusionsprotein kann durch Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathion-Agarose-Harz gereinigt werden. Rekombinante PSE, die nicht an GST fusioniert ist, kann durch Spaltung des Fusionsproteins mit Thrombin gewonnen werden.

35

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- ϕ 10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gnl) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem

residenten λ -Prophagen bereitgestellt, der ein T7 ϕ 1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.

Andere in prokaryotischen Organismen geeignete Vektoren sind dem
 5 Fachmann bekannt, diese Vektoren sind beispielsweise in *E. coli*
 pLG338, pACYC184, die pBR-Reihe, wie pBR322, die pUC-Reihe, wie
 pUC18 oder pUC19, die M13mp-Reihe, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2,
 pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, ϕ gt11 or pBdCI,
 in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus*
 10 pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667.

Eine Strategie zur Maximierung der Expression von rekombinantem
 Protein ist die Expression des Proteins in einem Wirtsbakterium,
 dessen Fähigkeit zur proteolytischen Spaltung des rekombinanten
 15 Proteins gestört ist (Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien
 (1990) 119-128). Eine weitere Strategie ist die Veränderung der
 Nukleinsäuresequenz der in einen Expressionsvektor zu inserieren-
 den Nukleinsäure, so dass die einzelnen Codons für jede Amino-
 20 säure diejenigen sind, die vorzugsweise in einem zur Expression
 ausgewählten Bakterium, wie *C. glutamicum*, verwendet werden
 (Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Diese
 Veränderung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen erfolgt
 durch Standard-DNA-Synthesetechniken.

25

Bei einer weiteren Ausführungsform ist der PSE-Expressionsvektor
 ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression
 in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYepSec1 (Baldari et al.
 (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMfa (Kurjan und Herskowitz (1982)
 30 *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,
 35 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
 40 Press: San Diego]. Weitere geeignete Hefevektoren sind beispiels-
 weise 2 \times M, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLye23.

Alternativ können die erfindungsgemäßen PSEs in Insektenzellen
 unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert
 45 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).

- Die oben genannten Vektoren bieten nur einen kleinen Überblick
5 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).
- 10 Bei noch einer weiteren Ausführungsform wird eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in Säugerzellen unter Verwendung eines Säuger-Expressionsvektors exprimiert. Beispiele für Säuger-Expressionsvektoren umfassen pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) und
15 pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195). Bei der Verwendung in Säugerzellen werden die Kontrollfunktionen des Expressionsvektors oft von viralen Regulationselementen bereitgestellt. Üblicherweise verwendete Promotoren stammen z.B. aus Polyoma, Adenovirus2, Cytomegalievirus und Simian Virus 40. Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und
20 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.
- 25 Bei einer anderen Ausführungsform kann der rekombinante Säuger-Expressionsvektor die Expression der Nukleinsäure vorzugsweise in einem bestimmten Zelltyp steuern (z.B. werden gewebespezifische Regulationselemente zur Expression der Nukleinsäure verwendet).
- 30 Gewebespezifische Regulationselemente sind im Fachgebiet bekannt. Nicht beschränkende Beispiele für geeignete gewebespezifische Promotoren sind u.a. der Albuminpromotor (leberspezifisch; Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1:268-277), lymphoidspezifische Promotoren (Calame und Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275),
35 insbesondere Promotoren von T-Zellrezeptoren (Winoto und Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733) und Immunglobulinen (Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740; Queen und Baltimore (1983) Cell 33:741-748), neuronspezifische Promotoren (z.B. Neurofilament-Promotor; Byrne und Ruddle (1989) PNAS 86:5473-5477), pankreas-
40 spezifische Promotoren (Edlund et al., (1985) Science 230:912-916) und milchdrüsenspezifische Promotoren (z.B. Milchserum-Promotor; US-Patent Nr. 4,873,316 und Europäische Patentanmeldung-Veröffentlichung Nr. 264,166). Auch entwicklungsregulierte Promotoren sind umfasst, z.B. die hox-Promotoren
45 der Maus (Kessel und Gruss (1990) Science 249:374-379) und der Fetoprotein-Promotor (Campes und Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546).

48

Bei einer weiteren Ausführungsform können die erfindungsgemäßen PSEs in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1 (3):239-251 und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus höheren

5 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

10 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.

15

Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzenzellen steuern können und funktionsfähig verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription,

20 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

25 alle anderen in Pflanzen funktionell aktiven Terminatoren sind geeignet.

Da die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebenen beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressionskassette

30 vorzugsweise andere funktionsfähig verbunden 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).

35

Die Pflanzengenexpression muss funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise durchführt. Bevorzugt sind Promotoren, welche die konstitutive Expression

40 herbeiführen (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.

45

49

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 Kermode, 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.

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. 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.

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 Alphaamylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091). Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Lipid- und Ölbiosynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos. Geeignete Promotoren sind der Napingen-Promotor aus Raps (US 5,608,152), der USP-Promotor aus Vicia faba (Bäumlein et al., 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; Bäumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233-9) sowie Promotoren, welche die samenspezifische Expression in Monokotyledonen-Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der lpt2- oder lpt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen (Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem

50

Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen).

Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die
5 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-
10 Promotor aus Arabidopsis, beschrieben in WO 99/46394.

Die Erfindung stellt zudem einen rekombinanten Expressions-
vektor bereit, umfassend ein erfindungsgemäßes DNA Molekül,
das in Antisense-Richtung in den Expressionsvektor kloniert
15 ist. d.h. das DNA-Molekül ist derart mit einer regulatorischen
Sequenz funktionsfähig verbunden, dass die Expression (durch
Transkription des DNA-Moleküls) eines RNA-Moleküls, das zur PSE-
mRNA "Antisense" ist, ermöglicht wird. Es können Regulations-
sequenzen ausgewählt werden, die funktionsfähig mit einer in
20 Antisense-Richtung klonierten Nukleinsäure verbunden sind und
die kontinuierliche Expression des Antisense-RNA-Moleküls in
einer Vielzahl von Zelltypen steuern, zum Beispiel können virale
Promotoren und/oder Enhancer oder Regulationssequenzen ausgewählt
werden, welche die konstitutive, gewebespezifische oder zelltyp-
25 spezifische Expression von Antisense-RNA steuern. Der Antisense-
Expressionsvektor kann in Form eines rekombinanten Plasmids,
Phagemids oder attenuierten Virus vorliegen, in dem Antisense-
Nukleinsäuren unter der Kontrolle eines hochwirksamen regulatori-
schen Bereichs produziert werden, dessen Aktivität durch den
30 Zelltyp bestimmt werden kann, in den der Vektor eingebracht
worden ist. Eine Erläuterung der Regulation der Genexpression
mittels Antisense-Genen siehe in Weintraub, H., et al., Anti-
sense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews -
Trends in Genetics, Bd. 1(1) 1986.

35 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Wirtszellen, in die
ein erfindungsgemäßer rekombinanter Expressionsvektor eingebracht
worden ist. Die Begriffe "Wirtszelle", "rekombinante Wirtszelle"
und "transgene Wirtszelle" werden hier untereinander austauschbar
40 verwendet. Selbstverständlich betreffen diese Begriffe nicht
nur die bestimmte Zielzelle, sondern auch die Nachkommen oder
potentiellen Nachkommen dieser Zelle. Da in aufeinanderfolgenden
Generationen aufgrund von Mutation oder Umwelteinflüssen be-
stimmte Modifikationen auftreten können, sind diese Nachkommen
45 nicht unbedingt mit der Parentalzelle identisch, sind jedoch
immer noch vom Umfang des Begriffs, wie hier verwendet, umfasst.

51

Eine Wirtszelle kann eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle sein. Zum Beispiel kann eine PSE in Bakterienzellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen, Pilzzellen oder Säugerzellen (wie Chinesischer Hamster-Ovarzellen (CHO) oder COS-Zellen), Algen, 5 Ciliaten, Pflanzenzellen, Pilzen oder anderen Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, exprimiert werden. Andere geeignete Wirtszellen sind dem Fachmann geläufig.

Vektor-DNA lässt sich in prokaryotische oder eukaryotische Zellen 10 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, ein- 15 schließlich 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 20 Pflanzenzellen, lassen sich finden in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern, wie Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium protocols, Hrsgb: Gartland 25 und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Über die stabile Transfektion von Säugerzellen ist bekannt, dass je nach verwendetem Expressionsvektor und verwendeter Transfektionstechnik nur ein kleiner Teil der Zellen die fremde DNA 30 in Genom integriert. Zur Identifikation und Selektion dieser Integrierten wird gewöhnlich ein Gen, das einen selektierbaren Marker (z.B. Resistenz gegen Antibiotika) kodiert, zusammen mit dem Gen von Interesse in die Wirtszellen eingebracht. Bevorzugte selektierbare Marker umfassen solche, welche Resistenz gegen 35 Medikamente, wie G418, Hygromycin und Methotrexat, verleihen, oder in Pflanzen solche, welche Resistenz gegen ein Herbizid, wie Glyphosphat oder Glufosinat, verleihen. Weitere geeignete Marker sind beispielsweise Marker, welche Gene kodieren, die an Biosynthesewegen von zum Beispiel Zuckern oder Aminosäuren beteiligt 40 sind, wie β -Galactosidase, *ura3* oder *ilv2*. Marker, welche Gene, wie Luziferase, *gfp* oder andere Fluoreszenzgene kodieren, sind ebenfalls geeignet. Diese Marker lassen sich in Mutanten verwenden, in denen diese Gene nicht funktionell sind, da sie beispielsweise mittels herkömmlicher Verfahren deletiert worden 45 sind. Ferner können Marker, welche eine Nukleinsäure kodieren, die einen selektierbaren Marker kodiert, in eine Wirtszelle auf dem gleichen Vektor eingebracht werden, wie derjenige, der eine

52

PSE kodiert, oder können auf einem gesonderten Vektor eingebracht werden. Zellen, die mit der eingebrachten Nukleinsäure stabil transfiziert worden sind, können zum Beispiel durch Medikamentenselektion identifiziert werden (z.B. überleben Zellen, die den
5 selektierbaren Marker integriert haben, wohingegen die anderen Zellen absterben).

Zur Erzeugung eines homolog rekombinierten Mikroorganismus wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines PSE-
10 Gens enthält, in den eine Deletion, Addition oder Substitution eingebracht worden ist, um dadurch das PSE-Gen zu verändern, z.B. funktionell zu disruptieren. Dieses PSE-Gen ist vorzugsweise ein *Physcomitrella patens*- oder *Phytophthora infestans*-PSE-Gen, es kann jedoch ein Homologon oder Analogon aus einer verwandten
15 Pflanze oder sogar aus einer Säuger-, Hefe- oder Insektenquelle verwendet werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor so gestaltet, dass das endogene PSE-Gen bei homologer Rekombination funktionell disruptiert wird (d.h. nicht länger ein funktionelles Protein kodiert, auch als Knock-out-
20 Vektor bezeichnet). Alternativ kann der Vektor so gestaltet sein, dass das endogene PSE-Gen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert wird, aber immer noch ein funktionelles Protein kodiert (z.B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich so verändert sein, dass dadurch
25 die Expression der endogenen PSE verändert wird). Zur Erzeugung einer Punktmutation über homologe Rekombination können auch als Chimeraplastie bekannte DNA-RNA-Hybride verwendet werden, die aus Cole-Strauss et al., 1999, *Nucleic Acids Research* 27(5):1323-1330 und Kmiec, *Gene therapy*, 19999, *American Scientist*, 87(3):240-247
30 bekannt sind.

Im Vektor für die homologe Rekombination ist der veränderte Abschnitt des PSE-Gens an seinem 5'- und 3'-Ende von zusätzlicher Nukleinsäure des PSE-Gens flankiert, so dass homologe Rekombi-
35 nation zwischen dem exogenen PSE-Gen, das auf dem Vektor vorliegt, und einem endogenen PSE-Gen in einem Mikroorganismus oder einer Pflanze möglich ist. Die zusätzliche flankierende PSE-Nukleinsäure ist für eine erfolgreiche homologe Rekombination mit dem endogenen Gen hinreichend lang. Gewöhnlich sind im Vektor
40 mehrere hundert Basenpaare bis zu Kilobasen flankierende DNA (sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende) enthalten (eine Beschreibung von Vektoren zur homologen Rekombination siehe z.B. in Thomas, K.R., und Capecchi, M.R. (1987) *Cell* 51:503 oder der Rekombination in *Physcomitrella patens* auf cDNA-Basis in Strepp et al.,
45 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (8):4368-4373). Der Vektor wird in einen Mikroorganismus oder eine Pflanzenzelle (z.B. mittels Polyethylenglycol-vermittelter DNA) eingebracht, und

53

Zellen, in denen das eingebrachte PSE-Gen mit dem endogenen PSE-Gen homolog rekombiniert ist, werden unter Verwendung im Fachgebiet bekannter Techniken selektiert.

- 5 Bei einer anderen Ausführungsform können rekombinante Organismen, wie Mikroorganismen, hergestellt werden, die ausgewählte Systeme enthalten, welche eine regulierte Expression des eingebrachten Gens ermöglichen. Der Einschluss eines PSE-Gens in einem Vektor, wobei es unter die Kontrolle des lac-Operons gebracht wird, 10 ermöglicht z.B. die Expression des PSE-Gens nur in Gegenwart von IPTG. Diese Regulationssysteme sind im Fachgebiet bekannt.

Eine erfindungsgemäße Wirtszelle, wie eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle, in Kultur oder auf einem Feld wachsend, 15 kann zur Produktion (d.h. Expression) einer PSE verwendet werden. In Pflanzen kann zusätzlich ein alternatives Verfahren durch direkten Transfer von DNA in sich entwickelnde Blüten über Elektroporation oder Gentransfer mittels Agrobacterium angewendet werden. Die Erfindung stellt folglich ferner Verfahren 20 zur Produktion von PSEs unter Verwendung der erfindungsgemäßen Wirtszellen bereit. Bei einer Ausführungsform umfasst das Verfahren die Anzucht der erfindungsgemäßen Wirtszelle (in die ein rekombinanter Expressionsvektor, der eine PSE kodiert, eingebracht worden ist, oder in deren Genom ein Gen eingebracht 25 worden ist, das eine Wildtyp- oder veränderte PSE kodiert) in einem geeigneten Medium, bis die PSE produziert worden ist. Das Verfahren umfasst bei einer weiteren Ausführungsform das Isolieren der PSEs aus dem Medium oder der Wirtszelle.

- 30 Wirtszellen, die im Prinzip zum Aufnehmen der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des erfindungsgemäßen neuen Genproduktes oder des erfindungsgemäßen Vektors geeignet sind, sind alle prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Die vorteilhafterweise verwendeten Wirtsorganismen sind Organismen, wie Bakterien, 35 Pilze, Hefen, nicht-humane Tier- oder Pflanzenzellen. Weitere vorteilhafte Organismen sind nicht-humane Tiere oder vorzugsweise Pflanzen oder Teile davon. Pilze, Hefen oder Pflanzen werden vorzugsweise verwendet, besonders bevorzugt Pilze oder Pflanzen, ganz besonders bevorzugt Pflanzen, wie Ölfruchtpflanzen, die 40 große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Nachtkerze, Canola, Erdnuss, Lein, Soja, Diestel, Sonnenblume, Borretsch, oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, 45 Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölplume, Kokosnuss) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße

54

Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Soja, Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss).

"Transgen" meint bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäure-
5 sequenz, einer Expressionskassette (= Genkonstrukt) oder
einem Vektor enthaltend besagte Nukleinsäuresequenz oder
einem Organismus transformiert mit den erfindungsgemäßen
Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder Vektor
alle solche durch gentechnische Methoden zustandgekommene
10 Konstruktionen, in denen sich entweder

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

20 sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden
oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei
die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen,
Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer
Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint
25 den natürlichen 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
30 zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens
50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt min-
destens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp.
Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise
die natürlich vorkommende Kombination des natürlichen Promotors
35 der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit dem entsprechenden
PSE-Gen - wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn
diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Ver-
fahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird.
Entsprechende Verfahren sind beispielsweise beschrieben in
40 US 5,565,350 oder WO 00/15815.

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene
Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen
Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder einem erfindungs-
45 gemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie

55

zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw.- oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen.

D. Isolierte PSE

5

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft isolierte PSEs und biologisch aktive Teile davon. Ein "isoliertes" oder "gereinigtes" Protein oder ein biologisch aktiver Teil davon ist im wesentlichen frei von zellulärem Material, wenn es durch
10 DNA-Rekombinationstechniken produziert wird, oder von chemischen Vorstufen oder andern Chemikalien, wenn es chemisch synthetisiert wird. Der Begriff "im wesentlichen frei von zellulärem Material" umfasst PSE-Präparationen, in denen das Protein von zellulären
15 Komponenten der Zellen, in denen es natürlich oder rekombinant produziert wird, getrennt ist. Bei einer Ausführungsform umfasst der Ausdruck "im wesentlichen frei von zellulärem Material" PSE-Präparationen mit weniger als etwa 30 % (bezogen auf das Trocken-
gewicht) nicht-PSE (hier auch als "verunreinigendes Protein" bezeichnet), stärker bevorzugt weniger als etwa 20 % nicht-PSE,
20 noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % nicht-PSE und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5 % nicht-PSE. Wenn die PSE oder ein biologisch aktiver Teil davon rekombinant hergestellt worden ist, ist sie/er auch im wesentlichen frei von Kultur-
medium, d.h. das Kulturmedium macht weniger als etwa 20 %,
25 stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5 % des Volumens der Proteinpräparation aus. Der Begriff "im wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien" umfasst PSE-Präparationen, in denen das Protein von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien
30 getrennt ist, die an der Synthese des Proteins beteiligt sind. Bei einer Ausführungsform umfasst der Begriff "im wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien" PSE-Präparationen mit weniger als etwa 30 % (bezogen auf das Trocken-
gewicht) chemischen Vorstufen oder nicht-PSE-Chemikalien, stärker
35 bevorzugt weniger als etwa 20 % chemischen Vorstufen oder nicht-PSE-Chemikalien, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10 % chemischen Vorstufen oder nicht-PSE-Chemikalien und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5 % chemischen Vorstufen oder nicht-PSE-Chemikalien. Bei bevorzugten Ausführungsformen weisen iso-
40 lierte Proteine oder biologisch aktive Teile davon keine verunreinigenden Proteine aus dem gleichen Organismus auf, aus dem die PSE stammt. Diese Proteine werden gewöhnlich durch rekombinante Expression zum Beispiel einer *Phytophthora infestans* PSE in anderen Pilzen, Pflanzen oder Mikroorganismen, beispiels-
45 weise Bakterien, wie *C. glutamicum*, Pilzen, wie *Mortierella*,

56

Hefe, wie *Saccharomyces*, oder Ciliaten, Algen oder Pflanzen wie *Phycomitrella patens* oder Ölfruchtpflanzen hergestellt.

Eine erfindungsgemäße isolierte PSE oder ein Teil davon
5 kann auch am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phytophthora infestans* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen oder am Fettsäurestoffwechsel beteiligt sein oder hat eine oder mehrere der in
Tabelle I angegebenen Aktivitäten. Bei bevorzugten Ausführungs-
10 formen umfasst das Protein oder der Teil davon eine Aminosäuresequenz, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 ist, dass das Protein oder der Teil davon die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phytophthora infestans* notwendigen Verbindungen oder am Transport
15 von Molekülen über diese Membranen oder am Fettsäurestoffwechsel teilzunehmen, beibehält. Der Teil des Proteins ist vorzugsweise ein biologisch aktiver Teil, wie hier beschrieben. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat eine erfindungsgemäße PSE eine der in SEQ ID NO:2 gezeigten Aminosäuresequenzen. Bei
20 einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat die PSE eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die, zum Beispiel unter stringenten Bedingungen, an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 hybridisiert. Bei noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat die PSE eine Aminosäuresequenz,
25 die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder noch homologer zu einer der Aminosäuresequenzen der
30 SEQ ID NO:2 ist. Die erfindungsgemäße bevorzugte PSE besitzt vorzugsweise auch mindestens eine der hier beschriebenen PSE-Aktivitäten. Zum Beispiel umfasst eine erfindungsgemäße bevorzugte PSE eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die, zum Beispiel unter stringenten Bedingungen,
35 an eine Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 hybridisiert und am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen in *Phytophthora infestans* notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilnehmen kann oder am Fettsäurestoffwechsel beteiligt sind oder eine oder mehrere der in Tabelle
40 I angegebenen Aktivitäten aufweist.

Bei anderen Ausführungsformen ist die PSE im wesentlichen homolog zu einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 und behält die funktionelle Aktivität des Proteins einer der Sequenzen der
45 SEQ ID NO:2 bei, ihre Aminosäuresequenz unterscheidet sich jedoch aufgrund von natürlicher Variation oder Mutagenese, wie eingehend im obigen Unterabschnitt I beschrieben. Bei einer weiteren Aus-

57

führungsform ist die PSE folglich ein Protein, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die mindestens etwa 50 bis 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 bis 70 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 bis 80 %, 80 bis 90 %, 90 bis 95 % und am stärksten bevorzugt
5 mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 ist und zumindest eine der hier beschriebenen PSE-Aktivitäten aufweist. Bei einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung ein
10 vollständiges Phytophthora infestans-Protein, das im wesentlichen homolog zu einer vollständigen Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 ist.

Biologisch aktive Teile einer PSE umfassen Peptide, umfassend Aminosäuresequenzen, die von der Aminosäuresequenz einer PSE
15 hergeleitet sind, z.B. eine in SEQ ID NO:2 gezeigte Aminosäuresequenz oder die Aminosäuresequenz eines Proteins, das zu einer PSE homolog ist, welche weniger Aminosäuren als die Vollängen-PSE oder das Vollängenprotein aufweisen, das zu einer PSE homolog
20 ist, und zumindest eine Aktivität einer PSE aufweisen. Gewöhnlich umfassen biologisch aktive Teile (Peptide, z.B. Peptide, die zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 oder mehr Aminosäuren lang sind) eine Domäne oder ein Motiv mit mindestens einer Aktivität einer PSE. Überdies können andere biologisch aktive Teile, in denen andere Bereiche des Proteins
25 deletiert sind, durch rekombinante Techniken hergestellt und bezüglich einer oder mehrerer der hier beschriebenen Aktivitäten untersucht werden. Die biologisch aktiven Teile einer PSE umfassen vorzugsweise ein/eine oder mehrere ausgewählte Domänen/
30 Motive oder Teile davon mit biologischer Aktivität.

PSEs werden vorzugsweise durch DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Zum Beispiel wird ein das Protein kodierendes Nukleinsäuremolekül in einen Expressionsvektor (wie vorstehend beschrieben) kloniert, der Expressionsvektor wird in eine Wirtszelle (wie vorstehend beschrieben) eingebracht, und die PSE
35 wird in der Wirtszelle exprimiert. Die PSE kann dann durch ein geeignetes Reinigungsschema mittels Standard-Proteinreinigungstechniken aus den Zellen isoliert werden. Alternativ zur rekombinanten Expression kann eine PSE, ein -Polypeptid, oder -Peptid
40 mittels Standard-Peptidsynthesetechniken chemisch synthetisiert werden. Überdies kann native PSE aus Zellen (z.B. Endothelzellen) z.B. unter Verwendung eines Anti-PSE-Antikörpers isoliert werden, der durch Standardtechniken produziert werden kann, wobei eine erfindungsgemäße PSE oder ein Fragment davon verwendet wird.

45

58

Die Erfindung stellt auch chimäre PSE-Proteine oder PSE-Fusionsproteine bereit. Wie hier verwendet, umfasst ein "chimäres PSE-Protein" oder "PSE-Fusionsprotein" ein PSE-Polypeptid, das funktionsfähig an ein nicht-PSE-Polypeptid gebunden ist. Ein

5 "PSE-Polypeptid" betrifft ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, die einer PSE entspricht, wohingegen ein "nicht-PSE-Polypeptid" ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz betrifft, die einem Protein entspricht, das im wesentlichen nicht homolog zu der PSE ist, z.B. ein Protein, das sich vom der PSE

10 unterscheidet und aus dem gleichen oder einem anderen Organismus stammt. Innerhalb des Fusionsproteins soll der Begriff "funktionsfähig verbunden" bedeuten, dass das PSE-Polypeptid und das nicht-PSE-Polypeptid so miteinander fusioniert sind, dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der verwendeten Sequenz

15 zugeschriebene Funktion erfüllen. Das nicht-PSE-Polypeptid kann an den N-Terminus oder den C-Terminus des PSE-Polypeptids fusioniert sein. Bei einer Ausführungsform ist das Fusionsprotein zum Beispiel ein GST-PSE-Fusionsprotein, bei dem die PSE-Sequenzen an den C-Terminus der GST-Sequenzen fusioniert

20 sind. Diese Fusionsproteine können die Reinigung der rekombinanten PSEs erleichtern. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Fusionsprotein eine PSE, die eine heterologe Signalsequenz an ihrem N-Terminus aufweist. In bestimmten Wirtszellen (z.B. Säuger-Wirtszellen) kann die Expression und/oder Sekretion einer

25 PSE durch Verwendung einer heterologen Signalsequenz gesteigert werden.

Ein erfindungsgemäßes chimäres PSE-Protein oder PSE-Fusionsprotein wird durch Standard-DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Zum Beispiel werden DNA-Fragmente, die unterschiedliche

30 Polypeptidsequenzen kodieren, gemäß herkömmlicher Techniken im Leseraster aneinander ligiert, indem beispielsweise glatte oder überhängende Enden zur Ligation, Restriktionsenzymspaltung zur Bereitstellung geeigneter Enden, Auffüllen kohäsiver Enden,

35 wie erforderlich, Behandlung mit alkalischer Phosphatase, um ungewollte Verknüpfungen zu vermeiden, und enzymatische Ligation eingesetzt werden. Bei einer weiteren Ausführungsform kann das Fusionsgen durch herkömmliche Techniken, einschließlich DNA-Syntheseautomaten, synthetisiert werden. Alternativ kann eine

40 PCR-Amplifizierung von Genfragmenten unter Verwendung von Ankerprimern durchgeführt werden, die komplementäre Überhänge zwischen aufeinanderfolgenden Genfragmenten erzeugen, die anschließend miteinander hybridisiert und reamplifiziert werden können, so dass eine chimäre Gensequenz erzeugt wird (siehe zum Beispiel

45 Current Protocols in Molecular Biology, Hrsgb. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992). Überdies sind viele Expressionsvektoren kommerziell erhältlich, die bereits eine Fusionseinheit (z.B. ein

59

GST-Polypeptid) kodieren. Eine PSE-kodierende Nukleinsäure kann in einen solchen Expressionsvektor kloniert werden, so dass die Fusionseinheit im Leseraster mit dem PSE-Protein verbunden ist.

- 5 Homologa der PSE können durch Mutagenese, z.B. durch spezifische Punktmutation oder Verkürzung der PSE, erzeugt werden. Der Begriff "Homologon", wie hier verwendet, betrifft eine variante Form der PSE, die als Agonist oder Antagonist der PSE-Aktivität wirkt. Ein Agonist der PSE kann im wesentlichen die gleiche
- 10 Aktivität wie die oder einen Teil der biologischen Aktivitäten der PSE beibehalten. Ein Antagonist der PSE kann eine oder mehrere Aktivitäten der natürlich vorkommenden Form der PSE durch zum Beispiel kompetitive Bindung an ein stromabwärts oder -aufwärts gelegenes Element der Stoffwechsellkaskade für Zell-
- 15 membrankomponenten, welche die PSE umfasst, oder durch Bindung an eine PSE, welche den Transport von Verbindungen über Zellmembranen vermittelt, hemmen, wodurch die Translokation gehemmt wird.
- 20 Bei einer alternativen Ausführungsform können Homologa der PSE durch Screening kombinatorischer Banken von Mutanten, z.B. Verkürzungsmutanten, der PSE hinsichtlich PSE-Agonisten- oder -Antagonisten-Aktivität identifiziert werden. Bei einer Aus-
- 25 führungsform wird eine variierte Bank von PSE-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt und durch eine variierte Genbank kodiert. Eine variierte Bank von PSE-Varianten kann z.B. durch enzymatische Ligation eines Gemisches von synthetischen Oligonukleotiden in Gensequenzen hergestellt werden, so dass sich ein degenerierter Satz potentieller
- 30 PSE-Sequenzen als individuelle Polypeptide oder alternativ als Satz größerer Fusionsproteine (z.B. für das Phage-Display), die diesen Satz von PSE-Sequenzen enthalten, exprimieren lässt. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller PSE-Homologa aus einer degenerierten Oligonukleotid-
- 35 sequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt und das synthetische Gen dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Satzes von Genen ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher
- 40 Sequenzen, die den gewünschten Satz an potentiellen PSE-Sequenzen kodieren, in einem Gemisch. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind im Fachgebiet bekannt (siehe z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike
- 45 et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

60

Zusätzlich können Banken von PSE-Fragmenten zur Herstellung einer variierten Population von PSE-Fragmenten für das Screening und für die anschließende Selektion von Homologa einer PSE verwendet werden. Bei einer Ausführungsform kann eine Bank von Fragmenten
5 der kodierenden Sequenz durch Behandeln eines doppelsträngigen PCR-Fragmentes einer kodierenden PSE-Sequenz mit einer Nuklease unter Bedingungen, unter denen Doppelstrangbrüche nur etwa einmal pro Molekül erfolgen, Denaturieren der doppelsträngigen DNA, Renaturieren der DNA unter Bildung doppelsträngiger DNA,
10 welche Sense/Antisense-Paare von verschiedenen Produkten mit Doppelstrangbrüchen umfassen kann, Entfernen einzelsträngiger Abschnitte aus neu gebildeten Duplices durch Behandlung mit S1-Nuklease und Ligieren der resultierenden Fragmentbank in einen Expressionsvektor erzeugt werden. Mit diesem Verfahren kann eine
15 Expressionsbank hergeleitet werden, die N-terminale, C-terminale und interne Fragmente der PSE verschiedener Größen kodiert.

Im Fachgebiet sind mehrere Techniken für das Screening von Genprodukten in kombinatorischen Banken, die durch Punktmutationen
20 oder Verkürzung hergestellt worden sind, und für das Screening von cDNA-Banken nach Genprodukten mit einer ausgewählten Eigenschaft bekannt. Diese Techniken lassen sich an das schnelle Screening der Genbanken anpassen, die durch kombinatorische Mutagenese von PSE-Homologa erzeugt worden sind. Die am häufigsten
25 verwendeten Techniken zum Screening großer Genbanken, die einer Analyse mit hohem Durchsatz unterworfen werden können, umfassen gewöhnlich das Klonieren der Genbank in replizierbare Expressionsvektoren, Transformieren von geeigneten Zellen mit der resultierenden Vektorenbank und Exprimieren der kombinatorischen
30 Gene unter Bedingungen, unter denen der Nachweis der gewünschten Aktivität die Isolation des Vektors, der das Gen kodiert, dessen Produkt nachgewiesen wurde, erleichtert. Recursive-Ensemble-Mutagenese (REM), eine neue Technik, die die Häufigkeit funktioneller Mutanten in den Banken erhöht, kann in Kombination
35 mit den Screeningtests zur Identifikation von PSE-Homologa verwendet werden (Arkin und Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331).

40 Bei einer weiteren Ausführungsform können Tests auf Zellbasis zur Analyse einer variierten PSE-Bank unter Verwendung von im Fachgebiet bekannten Verfahren ausgenutzt werden.

E. Erfindungsgemäße Verwendungen und Verfahren

Die hier beschriebenen Nukleinsäuremoleküle, Proteine, Protein-homologa, Fusionsproteine, Primer, Vektoren und Wirtszellen
5 können bei einem oder mehreren der nachstehenden Verfahren verwendet werden: Identifikation von *Phytophthora infestans* und verwandten Organismen, Kartierung der Genome von Organismen, die mit *Phytophthora infestans* verwandt sind, Identifikation und Lokalisierung von *Phytophthora infestans*-Sequenzen von Interesse,
10 Evolutionsstudien, Bestimmung von PSE-Proteinbereichen, die für die Funktion notwendig sind, Modulation einer PSE-Aktivität; Modulation des Stoffwechsels einer oder mehrerer Zellmembran-komponenten; Modulation des Transmembrantransports einer oder mehrerer Verbindungen sowie Modulation der zellulären Produktion
15 einer gewünschten Verbindung, wie einer Feinchemikalie. Die erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäuremoleküle haben eine Vielzahl von Verwendungen. Sie können zunächst zur Identifikation eines Organismus als *Phytophthora infestans* oder als naher Verwandter davon verwendet werden. Sie können auch zur Identifikation des
20 Vorliegens von *Phytophthora infestans* oder eines Verwandten davon in einer Mischpopulation von Mikroorganismen verwendet werden. Die Erfindung stellt die Nukleinsäuresequenzen einer Reihe von *Phytophthora infestans*-Genen bereit; durch Sondieren der extrahierten genomischen DNA einer Kultur einer einheit-
25 lichen oder gemischten Population von Mikroorganismen unter stringenten Bedingungen mit einer Sonde, die einen Bereich eines *Phytophthora infestans*-Gens oder von Teilen davon über-spannt, das für diesen Organismus einzigartig ist, kann man bestimmen, ob dieser Organismus vorliegt. *Phytophthora infestans*
30 selbst wird zwar nicht zur kommerziellen Produktion mehrfach ungesättigter Säuren verwendet, aber Oomyzeten sind prinzipiell zur Produktion von PUFAs geeignet. Daher eignen sich PSE-ver-wandte DNA-Sequenzen besonders zur Verwendung zur PUFA-Produktion in anderen Organismen.

35 Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Protein-moleküle als Marker für spezifische Bereiche des Genoms dienen. Dies ist nicht nur zur Kartierung des Genoms, sondern auch für funktionelle Studien von *Phytophthora infestans*-Proteinen
40 geeignet. Zur Identifikation des Genombereichs, an den ein be-stimmtes DNA-bindendes Protein von *Phytophthora infestans* bindet, könnte das *Phytophthora infestans*-Genom zum Beispiel gespalten werden und die Fragmente mit dem DNA-bindenden Protein inkubiert werden. Diejenigen, die das Protein binden, können zusätzlich
45 mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen, vorzugsweise mit leicht nachweisbaren Markierungen, sondiert werden; die Bindung eines solchen Nukleinsäuremoleküls an das Genomfragment

62

ermöglicht die Lokalisierung des Fragments auf der Genomkarte von *Phytophthora infestans* und erleichtert, wenn dies mehrmals mit unterschiedlichen Enzymen durchgeführt wird, eine rasche Bestimmung der Nukleinsäuresequenz, an die das Protein bindet.

- 5 Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem ausreichend homolog zu den Sequenzen verwandter Arten sein, dass diese Nukleinsäuremoleküle als Marker für die Konstruktion einer genomischen Karte bei verwandten Pilzen dienen können.
- 10 Die erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäuremoleküle eignen sich auch für Evolutions- und Proteinstruktur-Untersuchungen. Die Stoffwechsel- und Transportprozesse, an denen die erfindungsgemäßen Moleküle beteiligt sind, werden von vielen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen genutzt; durch Vergleich der
- 15 Sequenzen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle mit solchen, die ähnliche Enzyme aus anderen Organismen kodieren, kann der Evolutions-Verwandschaftsgrad der Organismen bestimmt werden. Entsprechend ermöglicht ein solcher Vergleich die Bestimmung, welche Sequenzbereiche konserviert sind und welche nicht, was
- 20 bei der Bestimmung von Bereichen des Proteins hilfreich sein kann, die für die Enzymfunktion essentiell sind. Dieser Typ der Bestimmung ist für Proteinengineering-Untersuchungen wertvoll und kann einen Hinweis darauf geben, wieviel Mutagenese das Protein tolerieren kann, ohne die Funktion zu verlieren.
- 25 Die Manipulation der erfindungsgemäßen PSE-Nukleinsäuremoleküle kann zur Produktion von PSEs mit funktionellen Unterschieden zu den Wildtyp-PSEs führen. Die Effizienz oder Aktivität dieser Proteine kann verbessert sein, sie können in größeren Anzahlen
- 30 als gewöhnlich in der Zelle zugegen sein, oder ihre Effizienz oder Aktivität kann verringert sein. Verbesserte Effizienz oder Aktivität bedeutet beispielsweise, dass das Enzym eine höhere Selektivität und/oder Aktivität, vorzugsweise eine mindestens 10 % höhere, besonders bevorzugt eine mindestens 20 % höhere
- 35 Aktivität, ganz besonders bevorzugt eine mindestens 30 % höhere Aktivität als das ursprüngliche Enzym aufweist.

- Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung einer erfindungsgemäßen PSE die Ausbeute, Produktion und/oder
- 40 Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie, welche ein solches verändertes Protein enthält, direkt beeinflussen kann. Die Gewinnung von Feinchemikalien-Verbindungen aus Kulturen von Ciliaten, Algen, Pflanzen oder Pilzen im großen Maßstab ist signifikant verbessert, wenn die Zelle die gewünschten
- 45 Verbindungen sezerniert, da diese Verbindungen aus dem Kulturmedium (im Gegensatz zur Extraktion aus der Masse der gezüchteten Zellen) leicht gereinigt werden können. Ansonsten lässt sich die

63

Reinigung verbessern, wenn die Zelle in vivo Verbindungen in einem spezialisierten Kompartiment mit einer Art Konzentrationsmechanismus speichert. Bei Pflanzen, die PSEs exprimieren, kann ein gesteigerter Transport zu besserer Verteilung innerhalb des Pflanzengewebes und der -organe führen. Durch Vergrößern der Anzahl oder der Aktivität von Transportermolekülen, welche Feinchemikalien aus der Zelle exportieren, kann es möglich sein, die Menge der produzierten Feinchemikalie, die im extrazellulären Medium zugegen ist, zu steigern, wodurch Ernte und Reinigung oder bei Pflanzen eine effizientere Verteilung erleichtert werden. Zur effizienten Überproduktion einer oder mehrerer Feinchemikalien sind dagegen erhöhte Mengen an Cofaktoren, Vorläufermolekülen und Zwischenverbindungen für die geeigneten Biosynthesewege erforderlich. Durch Vergrößern der Anzahl und/oder der Aktivität von Transporterproteinen, die am Import von Nährstoffen, wie Kohlenstoffquellen (d.h. Zuckern), Stickstoffquellen (d.h. Aminosäuren, Ammoniumsalzen), Phosphat und Schwefel, beteiligt sind, kann man die Produktion einer Feinchemikalie aufgrund der Beseitigung aller Einschränkungen des Nährstoffangebots beim Biosyntheseprozess verbessern. Fettsäuren, wie PUFAs, und Lipide, die PUFAs enthalten, sind selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimieren der Aktivität oder Erhöhen der Anzahl einer oder mehrerer erfindungsgemäßer PSEs, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Stören der Aktivität einer oder mehrerer PSEs, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann man somit die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmoleküle in Ciliaten, Algen, Pflanzen, Pilzen, Hefen oder anderen Mikroorganismen steigern.

30

Die Manipulation eines oder mehrerer erfindungsgemäßer PSE-Gene kann ebenfalls zu PSEs mit veränderten Aktivitäten führen, welche die Produktion einer oder mehrerer gewünschter Feinchemikalien aus Algen, Pflanzen, Ciliaten oder Pilzen indirekt beeinflussen. Die normalen biochemischen Stoffwechselprozesse führen z.B. zur Produktion einer Vielzahl an Abfallprodukten (z.B. Wasserstoffperoxid und andere reaktive Sauerstoffspezies), die diese Stoffwechsel-Prozesse aktiv stören können (z.B. nitriert Peroxynitrit bekanntlich Tyrosin-Seitenketten, wodurch einige Enzyme mit Tyrosin im aktiven Zentrum inaktiviert werden (Groves, J.T. (1999) Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2);226-235)). Diese Abfallprodukte werden zwar üblicherweise ausgeschieden, aber die zur fermentativen Produktion im großen Maßstab verwendeten Zellen werden für die Überproduktion einer oder mehrerer Feinchemikalien optimiert und können somit mehr Abfallprodukte produzieren als für eine Wildtypzelle üblich. Durch Optimieren der Aktivität einer oder mehrerer erfindungsgemäßer PSEs, die am Export von Ab-

45

64

fallmolekülen beteiligt sind, kann man die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern und eine effiziente Stoffwechselaktivität aufrechterhalten. Auch das Vorliegen hoher intrazellulärer Mengen der gewünschten Feinchemikalie kann tatsächlich für die Zelle
5 toxisch sein, so dass man durch Steigern der Fähigkeit der Zelle zur Sekretion dieser Verbindungen die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern kann.

Die erfindungsgemäßen PSEs können ferner so manipuliert sein,
10 dass die relativen Mengen verschiedener Lipid- und Fettsäuremoleküle verändert werden. Dies kann eine entscheidende Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften hat, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die
15 Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran beeinflussen, was, wie vorstehend erläutert, den Export von Abfallprodukten oder der produzierten Feinchemikalie oder den Import notwendiger Nährstoffe modifizieren kann. Diese Änderungen
20 der Membranfluidität können auch die Integrität der Zelle entscheidend beeinflussen; Zellen mit vergleichsweise schwächeren Membranen sind anfälliger gegenüber abiotischen und biotischen Stressbedingungen, welche die Zelle beschädigen oder abtöten können. Durch Manipulieren von PSEs, die an der Produktion von
25 Fettsäuren und Lipiden für den Membranaufbau beteiligt sind, so dass die resultierende Membran eine Membranzusammensetzung hat, die für die in den Kulturen, die zur Produktion von Feinchemikalien verwendet werden, herrschenden Umweltbedingungen empfänglicher sind, sollte ein größerer Anteil der Zellen
30 überleben und sich vermehren. Größere Mengen an produzierenden Zellen sollten sich in größeren Ausbeuten, höherer Produktion oder Effizienz der Produktion der Feinchemikalie aus der Kultur manifestieren.

35 Die vorstehend genannten Mutagenesestrategien für PSEs, die zu erhöhten Ausbeuten einer Feinchemikalie führen sollen, sollen nicht beschränkend sein; Variationen dieser Strategien sind dem Fachmann leicht ersichtlich. Unter Verwendung dieser Mechanismen und mit Hilfe der hier offenbarten Mechanismen können die
40 erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle zur Erzeugung von rekombinanten bzw. transgenen Algen, Ciliaten, Pflanzen, nicht-humanen Tieren, Pilzen oder anderen Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, verwendet werden, die mutierte PSE-Nukleinsäure- und Proteinmoleküle exprimieren, so dass die Ausbeute, Produktion
45 und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung verbessert wird. Diese gewünschte Verbindung kann ein beliebiges natürliches Produkt von Algen, Ciliaten, Pflanzen, Tieren, Pilzen

65

oder *C. glutamicum* sein, welches die Endprodukte von Biosynthesewegen und Zwischenprodukte natürlich vorkommender Stoffwechselwege umfasst, sowie Moleküle, die im Stoffwechsel dieser Zellen nicht natürlich vorkommen, die jedoch von den erfindungsgemäßen
5 Zellen produziert werden.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist ein Verfahren zur Produktion von PUFAs, wobei das Verfahren das Züchten eines Organismus, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein
10 erfindungsgemäßes Genkonstrukt oder einen erfindungsgemäßen Vektor umfasst, welche ein Polypeptid kodieren, das C₁₆- und/oder C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül um mindestens zwei Kohlenstoffatome unter Bedingungen,
15 längert, umfasst. Durch dieses Verfahren hergestellte PUFAs lassen sich durch Ernten der Organismen entweder aus der Kultur, in der sie wachsen, oder von dem Feld, Aufbrechen und/oder Extrahieren des geernteten Materials mit einem organischen Lösungsmittel isolieren. Aus diesem Lösungsmittel kann das Öl, das
20 Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Glycolipide, Triacylglycerine und/oder freie Fettsäuren mit höherem Gehalt an PUFAs enthält, isoliert werden. Durch basische oder saure Hydrolyse der Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Glycolipide, Triacylglycerine können die freien Fettsäuren mit höherem Gehalt an
25 PUFAs isoliert werden. Ein höherer Gehalt an PUFAs bedeutet mindestens 5 %, vorzugsweise 10 %, besonders bevorzugt 20 %, ganz besonders bevorzugt 40 % mehr PUFAs als der ursprüngliche Organismus beispielsweise ein Oomyzet wie *Phytophthora* oder einer Pflanze wie einer Ölfruchtpflanze, der/die keine zusätzliche
30 Nukleinsäure, die die erfindungsgemäße Elongase kodiert, besitzt. Weiterhin besitzen die vorgenannten Öle, Lipide, Phospholipide, Sphingolipide, Glycolipide, Triacylglycerine und/oder freie Fettsäuren mit höherem Gehalt an PUFAs eine andere Zusammensetzung als die Zusammensetzung der Ausgangsorganismen. Dies gilt insbesondere für Pflanzen, die länger-kettige mehrfach ungesättigte
35 C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuren wie DHA, EPA oder ARA natürlicherweise nicht enthalten.

Vorzugsweise sind die durch dieses Verfahren produzierten
40 PUFAs C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise drei oder vier Doppelbindungen, besonders bevorzugt drei Doppelbindungen. Diese C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuremoleküle lassen sich aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure
45 isolieren. Geeignete Organismen sind beispielsweise die vorstehend erwähnten. Bevorzugte Organismen sind transgene Pflanzen.

66

Eine erfindungsgemäße Ausführungsform sind Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, besonders bevorzugt Öl, Lipid oder eine Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs umfassen und von 5 transgenen Pflanzen herrühren.

Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung des Öls, Lipids oder der Fettsäurezusammensetzung in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

10

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefasst werden sollten. Der Inhalt sämtlicher in dieser Patentanmeldung zitierten Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und 15 veröffentlichten Patentanmeldungen ist hier durch Bezugnahme aufgenommen.

Beispiele

20 Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

a) Allgemeine Klonierungsverfahren:

Klonierungsverfahren, wie beispielsweise Restriktionsspaltungen, 25 Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose- und Nylonmembranen, Verbindung von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli- und Hefe-Zellen, Züchtung von Bakterien und Sequenzanalyse rekombinanter DNA, wurden durchgeführt wie beschrieben in 30 Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) oder Kaiser, Michaelis und Mitchell (1994) "Methods in Yeast Genetics" (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-451-3).

35 b) Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn im Text nicht anders angegeben, in p. A.-Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und 40 Sigma (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden unter Verwendung von reinem pyrogenfreiem Wasser, im nachstehenden Text als H₂O bezeichnet, aus einer Milli-Q-Wassersystem-Wasserreinigungsanlage (Millipore, Eschborn) hergestellt. Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme und molekularbiologische Kits wurden 45 bezogen von den Firmen AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Biometra (Göttingen), Boehringer (Mannheim), Genomed (Bad Oeynhausen), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), Novagen

(Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande). Wenn nicht anders angegeben, wurden sie nach den Anweisungen des Herstellers verwendet.

5

Beispiel 2: Konstruktion der cDNA-Bank

- Zur Konstruktion der cDNA-Bank wurde die Erststrangsynthese unter Verwendung von Reverser Transkriptase aus Maus-Leukämie-Virus
- 10 (Roche, Mannheim, Deutschland) und Oligo-d(T)-Primern, die Zweitstrangsynthese durch Inkubation mit DNA-Polymerase I, Klenow-Enzym und RNase H-Spaltung bei 12°C (2 Std.), 16°C (1 Std.) und 22°C (1 Std.) erzielt. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65°C (10 min) gestoppt und anschließend auf Eis überführt.
- 15 Doppelsträngige DNA-Moleküle wurde mit T4-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) bei 37°C (30 min) mit glatten Enden versehen. Die Nukleotide wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Sephadex-G50-Zentrifugiersäulen entfernt. EcoRI-Adapter (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurden mittels T4-DNA-Ligase (Roche, 12°C,
- 20 über Nacht) an die cDNA-Enden ligiert und durch Inkubation mit Polynukleotidkinase (Roche, 37°C, 30 min) phosphoryliert. Dieses Gemisch wurde der Trennung auf einem Low-Melting-Agarose-Gel unterworfen. DNA-Moleküle über 300 Basenpaaren wurden aus dem Gel eluiert, Phenol-extrahiert, auf Elutip-D-Säulen (Schleicher
- 25 und Schüll, Daßel, Deutschland) konzentriert und an Vektorarme ligiert und in lambda-ZAPII-Phagen oder lambda-ZAP-Express-Phagen unter Verwendung des Gigapack Gold-Kits (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verpackt, wobei Material des Herstellers verwendet und seine Anweisungen befolgt wurden.

30

Beispiel 3: DNA-Sequenzierung und Computeranalyse

- cDNA-Banken, wie im Beispiel 4 beschrieben, wurden zur DNA-Sequenzierung nach Standardverfahren, insbesondere durch das
- 35 Kettenterminationsverfahren unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt, Deutschland), verwendet. Die Zufallssequenzierung wurde anschließend an die präparative Plasmidgewinnung aus cDNA-Banken über in vivo-Massenausschnitt und Retransformation von
- 40 DH10B auf Agarplatten durchgeführt (Einzelheiten zu Material und Protokoll von Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Plasmid-DNA wurde aus über Nacht gezüchteten E. coli-Kulturen, die in Luria-Brühe mit Ampicillin (siehe Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6))
- 45 gezüchtet worden waren, an einem Qiagen-DNA-Präparations-Roboter (Qiagen, Hilden) nach den Protokollen des Herstellers

68

präpariert. Sequenzierprimer mit den folgenden Nukleotidsequenzen wurden verwendet:

- 5' -CAGGAAACAGCTATGACC-3'
 5 5' -CTAAAGGGAACAAAAGCTG-3'
 5' -TGTAACGACGGCCAGT-3'

Die Sequenzen wurden unter Verwendung des Standard-Softwarepakets EST-MAX, das kommerziell von Bio-Max (München, Deutschland) geliefert wird, Prozessiert und kommentiert. Ein Klon mit schwachen Homologien zu bekannten Elongasen wurde eingehender charakterisiert.

Beispiel 4: Identifizierung des PSE1-Gens aus *P. infestans* und Analyse des cDNA-Klons PiPSE1

Eine EST-Sequenz (Datenbankeintrag: PI001002014r) wurde aufgrund schwacher Homologie mit bekannten Elongasen unter anderen Kandidatengenen als Zielgen in Betracht gezogen.

Für den Sequenzvergleich wurde das Programm BESTFIT verwendet, d.h. die BLOSUM-Aminosäuresubstitutions-Matrizen, wobei auf Henikoff, S., und Henikoff, J.G. (1992), Amino acid substitution matrices from protein blocks, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, verwiesen wird.

Die Sequenz des Klons mit der Datenbank-Nr. PI001002014r wurde für den Vergleich mit der elol1-Peptidsequenz aus Hefe verwendet. Da der neue *P. infestans* Klon nicht vollständig war, wurde ausgehend von der *P. infestans* cDNA Bank der korespondierende full length Klon isoliert (PiPSE1). Hierzu wurde eine Digoxigenin-markierte Sonde durch PCR mittels des PCR DIG synthesis kits (Roche) hergestellt, wobei PI001002014 als Template diente. Für die PCR wurden folgende Primer verwendet:

PI-DIGf: cacaccatcatgtacacttactac
 PI-DIGr: caacttcttcttcgattcctccac

Die isolierte markierte Sonde wurde für ein Screening der *P. infestans* cDNA Bank verwendet (entsprechend den Angaben des Herstellers, Stratagene). Ein Fragment von 1046 bp Länge wurde isoliert und als PiPSE1 bezeichnet. Das Offene-Leseraster ist 837 bp lang und kodiert für ein Protein von 278 Aminosäuren mit einer berechneten Molekularen Masse von 32,1 kDa. Sequenzvergleiche ergaben folgende Sequenzidentitäten, bzw. -ähnlichkeiten: 26 % / 43 % mit der *Physcomitrella patens* PSE1p, 23 % / 37 % mit

70

Oligonukleotid-Hybridisierungslösung:

- 6 x SSC
- 0,01 M Natriumphosphat
- 5 1 mM EDTA (pH 8)
- 0,5 % SDS
- 100 μ g/ml denaturierte Lachssperma-DNA
- 0,1 % fettarme Trockenmilch

- 10 Während der Hybridisierung wurde die Temperatur schrittweise auf 5 bis 10°C unter die berechnete Oligonukleotid-T_m oder bis auf Raumtemperatur (bedeutet RT = ~ 23°C in allen Experimenten, wenn nicht anders angegeben) gesenkt, gefolgt von Waschschrritten und Autoradiographie. Das Waschen wurde mit extrem niedriger
- 15 Stringenz durchgeführt, zum Beispiel 3 Waschschrritte unter Verwendung von 4 x SSC. Weitere Einzelheiten sind wie von Sambrook, J., et al. (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, oder Ausubel, F.M., et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley &
- 20 Sons, beschrieben.

Herstellung spezifischer Antikörper beispielsweise unter

Beispiel 6: Northern-Hybridisierung

- 25 Für die RNA-Hybridisierung wurden 20 μ g Gesamt-RNA oder 1 μ g poly(A)⁺-RNA mittels Gelelektrophorese in Agarosegelen mit einer Stärke von 1,25 % unter Verwendung von Formaldehyd, wie beschrieben in Amasino (1986, Anal. Biochem. 152, 304) auf-
- 30 getrennt, mittels Kapillaranziehung unter Verwendung von 10 x SSC auf positiv geladene Nylonmembranen (Hybond N+, Amersham, Braunschweig) übertragen, mittels UV-Licht immobilisiert und 3 Stunden bei 68°C unter Verwendung von Hybridisierungspuffer (10 % Dextransulfat Gew./Vol., 1 M NaCl, 1 % SDS, 100 mg Herings-
- 35 sperma-DNA) vorhybridisiert. Die Markierung der DNA-Sonde mit dem Highprime DNA labeling-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) erfolgte während der Vorhybridisierung unter Verwendung von alpha-³²P-dCTP (Amersham, Braunschweig, Deutschland). Die Hybridisierung wurde nach Zugabe der markierten DNA-Sonde im gleichen
- 40 Puffer bei 68°C über Nacht durchgeführt. Die Waschschrritte wurden zweimal für 15 min unter Verwendung von 2 X SSC und zweimal für 30 min unter Verwendung von 1 X SSC, 1 % SDS, bei 68°C durchgeführt. Die Exposition der verschlossenen Filter wurde bei -70°C für einen Zeitraum von 1 bis 14 T durchgeführt.

45

71

Beispiel 7: Plasmide für die Pflanzentransformation

Zur Pflanzentransformation können binäre Vektoren, wie pBinAR verwendet werden (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 5 221-230). Die Konstruktion der binären Vektoren kann durch Ligation der cDNA in Sense- oder Antisense-Orientierung in T-DNA erfolgen. 5' der cDNA aktiviert ein Pflanzenpromotor die Transkription der cDNA. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich 3' von der cDNA.

10

Die gewebespezifische Expression lässt sich unter Verwendung eines gewebespezifischen Promotors erzielen. Beispielsweise kann die samenspezifische Expression erreicht werden, indem der Napin- oder der LeB4- oder der USP-Promotor 5' der cDNA einkloniert 15 wird. Auch jedes andere samenspezifische Promotorelement kann verwendet werden. Zur konstitutiven Expression in der ganzen Pflanze lässt sich der CaMV-35S-Promotor verwenden.

Das exprimierte Protein kann unter Verwendung eines Signal- 20 peptids, beispielsweise für Plastiden, Mitochondrien oder das Endoplasmatische Retikulum, in ein zelluläres Kompartiment dirigiert werden (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423). Das Signalpeptid wird 5' im Leseraster mit der cDNA einkloniert, um die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsprotein 25 zu erreichen.

Beispiel 8: Transformation von Agrobacterium

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann zum 30 Beispiel unter Verwendung des GV3101- (pMP90-) (Koncz und Schell, Mol. Gen. Genet. 204 (1986) 383-396) oder LBA4404- (Clontech) Agrobacterium tumefaciens-Stamms durchgeführt werden. Die Transformation kann durch Standard-Transformationstechniken durchgeführt werden (Deblaere et al., Nucl. Acids. Res. 12 (1984), 35 4777-4788).

Beispiel 9: Pflanzentransformation

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann unter 40 Verwendung von Standard-Transformations- und Regenerations-techniken durchgeführt werden (Gelvin, Stanton B., Schilperoort, Robert A., Plant Molecular Biology Manual, 2. Aufl., Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995, in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R., Thompson, John E., 45 Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993, 360 S., ISBN 0-8493-5164-2).

72

- Beispielsweise kann Raps mittels Kotyledonen- oder Hypokotyltransformation transformiert werden (Moloney et al., Plant Cell Report 8 (1989) 238-242; De Block et al., Plant Physiol. 91 (1989) 694-701). Die Verwendung von Antibiotika für die Agro-
- 5 bacterium- und Pflanzenselektion hängt von dem für die Transformation verwendeten binären Vektor und Agrobacterium-Stamm ab. Die Rapsselektion wird gewöhnlich unter Verwendung von Kanamycin als selektierbarem Pflanzenmarker durchgeführt.
- 10 Der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer in Flachs lässt sich unter Verwendung von beispielsweise einer von Mlynarova et al. (1994) Plant Cell Report 13:282-285 beschriebenen Technik durchführen.
- 15 Die Transformation von Soja kann unter Verwendung von beispielsweise einer in EP-A-0 0424 047 (Pioneer Hi-Bred International) oder in EP-A-0 0397 687, US 5,376,543, US 5,169,770 (University Toledo) beschriebenen Technik durchgeführt werden.
- 20 Die Pflanzentransformation unter Verwendung von Teilchenbeschuss, Polyethylenglycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbonatfaser-Technik ist beispielsweise beschrieben von Freeling und Walbot "The maize handbook" (1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York).
- 25
- Beispiel 10: *In vivo*-Mutagenese
- Die *in vivo*-Mutagenese von Mikroorganismen kann mittels Passage der Plasmid- (oder einer anderen Vektor-) DNA durch E. coli
- 30 oder andere Mikroorganismen (z.B. Bacillus spp. oder Hefen, wie Saccharomyces cerevisiae), bei denen die Fähigkeiten, die Unversehrtheit ihrer genetischen Information aufrechtzuerhalten, gestört ist, erfolgen. Übliche Mutator-Stämme haben Mutationen in den Genen für das DNA-Reparatursystem (z.B. mutHLS, mutD, mutT
- 35 usw.; als Literaturstelle siehe Rupp, W.D. (1996) DNA repair mechanisms, in: Escherichia coli and Salmonella, S. 2277-2294, ASM: Washington). Diese Stämme sind dem Fachmann bekannt. Die Verwendung dieser Stämme ist beispielsweise in Greener, A., und Callahan, M. (1994) Strategies 7:32-34, erläutert. Der Transfer
- 40 mutierter DNA-Moleküle in Pflanzen erfolgt vorzugsweise nach Selektion und Test der Mikroorganismen. Transgene Pflanzen werden nach verschiedenen Beispielen im Beispielteil dieses Dokumentes erzeugt.

73

Beispiel 11: Untersuchung der Expression eines rekombinanten
Genproduktes in einem transformierten Organismus

Die Aktivität eines rekombinanten Genproduktes im transformierten
5 Wirtsorganismus wurde auf der Transkriptions- und/oder der
Translationsebene gemessen.

Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Menge an Transkrip-
tion des Gens (ein Hinweis auf die Menge an RNA, die für die
10 Translation des Genproduktes zur Verfügung steht) ist die Durch-
führung eines Northern-Blots (als Bezugsstelle siehe Ausubel
et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley:
New York, oder den oben erwähnten Beispielteil), wobei ein
Primer, der so gestaltet ist, dass er an das Gen von Interesse
15 bindet, mit einer nachweisbaren Markierung (gewöhnlich radioaktiv
oder chemilumineszent) markiert wird, so dass, wenn die Gesamt-
RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel auf-
getrennt, auf eine stabile Matrix transferiert und mit dieser
Sonde inkubiert wird, die Bindung und das Ausmaß der Bindung der
20 Sonde das Vorliegen und auch die Menge der mRNA für dieses Gen
anzeigt. Diese Information zeigt den Grad der Transkription des
transformierten Gens an. Zelluläre Gesamt-RNA kann aus Zellen,
Gewebe oder Organen mit mehreren Verfahren, die alle im Fach-
gebiet bekannt sind, wie zum Beispiel das von Bormann, E.R.,
25 et al. (1992) Mol. Microbiol. 6:317-326 beschriebene, präpariert
werden.

Zur Untersuchung des Vorliegens oder der relativen Menge an von
dieser mRNA translatiertem Protein können Standardtechniken, wie
30 ein Western-Blot, eingesetzt werden (siehe beispielsweise Ausubel
et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley:
New York). Bei diesem Verfahren werden die zellulären Gesamt-
Proteine extrahiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt,
auf eine Matrix, wie Nitrozellulose, übertragen und mit einer
35 Sonde, wie einem Antikörper, der spezifisch an das gewünschte
Protein bindet, inkubiert. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer
chemilumineszenten oder kolorimetrischen Markierung versehen,
die sich leicht nachweisen lässt. Das Vorliegen und die Menge
der beobachteten Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge
40 des gewünschten, in der Zelle vorliegenden mutierten Proteins an.

Beispiel 12: Analyse der Auswirkung der rekombinanten Proteine auf die Produktion des gewünschten Produktes

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, 5 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 Kompo- 10 nenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analyse-techniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische 15 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, 20 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 25 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).

30

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 35 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 40 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.

Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist 45 es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamt-

75

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

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

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

25

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 m, 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.

Bei Fettsäuren, für die keine Standards verfügbar sind, muss die Identität über Derivatisierung und anschließende GC-MS-Analyse gezeigt werden. Beispielsweise muss die Lokalisierung von Fettsäuren mit Dreifachbindung über GC-MS nach Derivatisierung mit

76

4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998, siehe oben) gezeigt werden.

5 Beispiel 13: Expressionskonstrukte in heterologen mikrobiellen Systemen

Stämme, Wachstumsbedingungen und Plasmide

- Der *Escherichia coli*-Stamm XL1 Blue MRF' kan (Stratagene) wurde zur Subklonierung der neuen Elongase piPSE1 aus *Phytophthora infestans* verwendet. Für die funktionelle Expression dieses Gens verwendeten wir den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm INVSc 1 (Invitrogen Co.). *E. coli* wurde in Luria-Bertini-Brühe (LB, Duchefa, Haarlem, Niederlande) bei 37°C gezüchtet. Wenn nötig, wurde Ampicillin (100 mg/Liter) zugegeben, und 1,5 % Agar (Gew./Vol.) wurde für feste LB-Medien hinzugefügt. *S. cerevisiae* wurde bei 30°C entweder in YPG-Medium oder in komplettem Minimalmedium ohne Uracil (CMdum; siehe in: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, L.B., Coen, D.M., und Varki, A. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York) mit entweder 2 % (Gew./Vol.) Raffinose oder Glucose gezüchtet. Für feste Medien wurden 2 % (Gew./Vol.) Bacto™-Agar (Difco) hinzugefügt. Die zur Klonierung und Expression verwendeten Plasmide waren pUC18 (Pharmacia) und pYES2 (Invitrogen Co.).

Klonierung und Expression einer PUFA-spezifischen Elongase aus *Phytophthora infestans*

- Für die Expression in Hefe wurde der *Phytophthora infestans* - cDNA-Klon piPSE1, der das PUFA-spezifische Elongase- (PSE1-) Gen kodiert, zuerst so modifiziert, dass eine KpnI-Restriktionsstelle und die Hefe-Konsensussequenz für hoch-effiziente Translation (Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes, *Cell* 44, 283-292) neben dem Startcodon und eine XbaI-Restriktionsstelle, die das Stopcodon flankierte, erhalten wurden. Zur Amplifikation des offenen Leserahmens wurde ein Primerpaar, das komplementär zu dessen 5'- und 3'-Enden war, synthetisiert.

40

ppex1f: cggggtaccacataatgtcgactgagctactgcag

ppex1r: cactagtctagattccaacttcttcttcgattcc

- 45 Die PCR-Reaktion wurde mit Plasmid-DNA als Matrize in einem Thermocycler (Biometra) mit der Pfu-DNA- (Stratagene) Polymerase und dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt: 3 min bei 96°C,

77

gefolgt von 30 Zyklen mit 30 s bei 96°C, 30 s bei 55°C und 2 min bei 72°C, 1 Zyklus mit 10 min bei 72°C und Stop bei 4°C.

- Die korrekte Größe des amplifizierten DNA-Fragments von 883 bp wurde mittels Agarose-TBE-Gelelektrophorese bestätigt. Die amplifizierte DNA wurde aus dem Gel mit dem QIAquick-Gelextraktionskit (QIAGEN) extrahiert und in die SmaI-Restriktionsstelle des dephosphorylierten Vektors pUC18 unter Verwendung des Sure Clone Ligation Kit (Pharmacia) ligiert, wobei pUCPSE1 erhalten wurde.
- 10 Nach der Transformation von *E. coli* XL1 Blue MRF' kan wurde eine DNA-Minipräparation (Riggs, M.G., & McLachlan, A. (1986) A simplified screening procedure for large numbers of plasmid mini-preparation. *BioTechniques* 4, 310-313) an 24 ampicillin-resistenten Transformanten durchgeführt, und positive Klone
- 15 wurden mittels BamHI-Restriktionsanalyse identifiziert. Die Sequenz des klonierten PCR-Produktes wurde mittels Resequenzierung unter Verwendung des ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) bestätigt.
- 20 Die Plasmid-DNA von pUC-PSE1 wurde zudem mit KpnI/XbaI gespalten und das erhaltene ~900 bp-Fragment in die KpnI/XbaI -Restriktionsstelle des dephosphorylierten Hefe-*E. coli*-Shuttlevektors pYES2 ligiert, wobei pY2PSE1 erhalten wurde. Nach der Transformation
- 25 von *E. coli* und DNA-Minipräparation aus den Transformaten wurde die Orientierung des DNA-Fragments im Vektor durch HindIII-Spaltung überprüft. Ein Klon wurde für die DNA-Maxipräparation mit dem Nucleobond® AX 500 Plasmid-DNA-Extraktionskit (Macherey-Nagel, Düringen) gezüchtet.
- 30 *Saccharomyces INVSc1* wurde mit pY2PSE1 und pYES2 mittels eines modifizierten PEG/Lithiumacetat-Protokolls transformiert (Ausubel et al., 1995). Nach der Selektion auf CMdum-Agarplatten mit 2 % Glucose wurden vier pY2PSE11-Transformanten (pY2PSE1a-d) und
- 35 eine pYES2-Transformante zur weiteren Züchtung und funktionellen Expression ausgewählt.

Funktionelle Expression einer Elongaseaktivität in Hefe

40 Vorkultur:

- 20 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2 % (Gew./Vol.) Raffinose wurden mit den transgenen Hefeklonen (pY2PSE1a-d, pYES2) angeimpft und 3 T bei 30°C, 200 rpm gezüchtet, bis eine optische Dichte bei
- 45 600 nm (OD₆₀₀) von 1,5-2 erreicht war.

Hauptkultur:

Für die Expression wurden 20 ml CMDum-Flüssigmedium mit 2 % Raffinose und 1 % (Vol./Vol.) Tergitol NP-40 mit γ -Linolensäure 5 (γ -18:3) auf eine Endkonzentration von 0,003 % (Gew./Vol.) angereichert. Die Medien wurden mit den Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,2 mit 2 % (Gew./Vol.) Galaktose für 16 Std. induziert, wonach die Kulturen eine OD₆₀₀ von 0,8-1,2 erreicht hatten.

10**Fettsäureanalyse**

Die Gesamt-Fettsäuren wurden aus Hefekulturen extrahiert und mittels Gaschromatographie analysiert. Davon wurden Zellen 15 von 5 ml Kultur mittels Zentrifugation (1000 x g, 10 min, 4°C) geerntet und einmal mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0, gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Zur Herstellung des Fettsäuremethylester (FAMES) wurden die Zellsedimente mit 1 M methanolischer H₂SO₄ und 2 % (Vol./Vol.) Dimethoxypropan für 20 1 Std. bei 80°C behandelt. Die FAMES wurden zweimal mit 2 ml Petrolether extrahiert, einmal mit 100 mM NaHCO₃, pH 8,0, und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das organische Lösungsmittel wurde unter einem Argonstrom verdampft, und die FAMES wurden in 50 μ l Petrolether gelöst. Die 25 Proben wurden auf einer ZEBRON-ZB-Wax-Kapillarsäule (30 m, 0,32 mm, 0,25 μ m; Phenomenex) in einem Hewlett Packard-6850-Gaschromatograph mit einem Flammenionisationsdetektor aufgetrennt. Die Ofentemperatur wurde von 70°C (1 min halten) bis 200°C mit einer Rate von 20°C/min, dann auf 250°C (5 min halten) mit einer 30 Rate von 5°C/min und schließlich auf 260°C mit einer Rate von 5°C/min programmiert. Stickstoff wurde als Trägergas verwendet (4,5 ml/min bei 70°C). Die Fettsäuren wurden durch Vergleich mit Retentionszeiten von FAME-Standards (SIGMA) identifiziert.

35 Expressionsanalyse

Die Fettsäuremuster von fünf transgenen Hefestämmen in Mol.-% sind in Tabelle I gezeigt.

40 Die Verhältnisse der zugegebenen und aufgenommenen γ -Linolensäure sind durch fettgedruckte Zahlen hervorgehoben, die der elongierten Produkte durch rote Zahlen und die der elongierten γ -Linolensäure durch fettgedruckte Zahlen (letzte Zeile).

45

79

Die GC-Analyse von FAMES, die aus Gesamt-Lipiden der mit pYES2 (i/Kontrolle) und pY2PSE1 transformierten Hefen ist in Figur 1 gezeigt. Für die Analyse wurden die transgenen Hefen in Anwesenheit von γ -18:3 gezüchtet..

5

Die Ergebnisse zeigen, dass γ -18:3 in großen Mengen in alle transgenen Hefen eingebaut worden ist. Alle vier transgenen Hefeklone, die mit pY2PSE1 transformiert wurden, zeigen einen zusätzlichen Peak im Gaschromatogramm, der durch Vergleich der Retentionszeiten als 20:3^{A8,11,14} identifiziert wurde. Eine Gaschromatographie/Massenspektroskopie kann zusätzliche Unterstützung zur Bestätigung dieser Identität liefern.

Die identifizierten Produkte zeigten, dass die Nukleotidsequenz von PiPSE1 eine Δ^6 -selektive Fettsäure-Elongase aus dem Moos *Physcomitrella patens* kodiert, die zur Bildung neuer Fettsäuren in transgenen Hefen führt.

Weitere Fütterungsexperimente mit verschiedenen anderen Fettsäuren (z.B. Linolsäure (18:2^{A9,12?}), Stearidonsäure (18:4^{A6,9,12,15})) können zur detaillierteren Bestätigung der Substratspezifität dieser Elongase durchgeführt werden.

Beispiel 14: Reinigung des gewünschten Produktes aus transformierten Organismen allgemein

Die Gewinnung des gewünschten Produktes aus Pflanzenmaterial oder Pilzen, Algen, Ciliaten, tierischen Zellen oder aus dem Überstand der vorstehend beschriebenen Kulturen kann durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen. Wird das gewünschte Produkt nicht aus den Zellen sezerniert, können die Zellen aus der Kultur durch langsame Zentrifugation geerntet werden, die Zellen können durch Standardtechniken, wie mechanische Kraft oder Ultraschallbehandlung, lysiert werden. Organe von Pflanzen können mechanisch von anderem Gewebe oder anderen Organen getrennt werden. Nach der Homogenisation werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt, und die Überstandsfraction, welche die löslichen Proteine enthält, wird zur weiteren Reinigung der gewünschten Verbindung aufbewahrt. Wird das Produkt aus gewünschten Zellen sezerniert, werden die Zellen durch langsame Zentrifugation aus der Kultur entfernt, und die Überstandsfraction wird zur weiteren Reinigung aufbewahrt.

Die Überstandsfraction aus jedem Reinigungsverfahren wird einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Molekül entweder auf dem Chromatographieharz zurückgehalten wird, viele Verunreinigungen in der Probe jedoch nicht,

oder die Verunreinigungen auf dem Harz zurückbleiben, die Probe hingegen nicht. Diese Chromatographieschritte können wenn nötig wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl geeigneter Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes zu reinigendes Molekül bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

10

Im Fachgebiet ist ein breites Spektrum an Reinigungsverfahren bekannt, und das vorstehende Reinigungsverfahren soll nicht beschränkend sein. Diese Reinigungsverfahren sind zum Beispiel beschrieben in Bailey, J.E., & Ollis, D.F., Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill: New York (1986).

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindungen kann durch Standardtechniken des Fachgebiets bestimmt werden. Dazu gehören Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologisch. Eine Übersicht über diese Analyseverfahren siehe in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11:27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A., et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

Äquivalente

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.

40

45

Patentansprüche

1. Isolierte Nukleinsäure, die für ein Polypeptid kodiert, das
5 C₁₆- oder C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen
in der Fettsäure um mindestens zwei Kohlenstoffatome
verlängert, wobei die Fettsäuren C_{18:3}^{Δ5t,9,12}, C_{20:3}^{Δ8,11,14},
C_{20:4}^{Δ5,8,11,14} und C_{20:5}^{Δ5,8,11,14,17} nicht verlängert werden.
- 10 2. Isolierte Nukleinsäure, umfassend eine Nukleotidsequenz,
die ein Polypeptid kodiert, das C₁₆- oder C₁₈-Fettsäuren
mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül
verlängert, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus
 - 15 a) einer in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz,
 - b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich gemäß dem degenerier-
ten genetischen Code von der in SEQ ID NO:2 dargestellten
Sequenz ableitet,
 - 20 c) Derivate der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz, die
Polypeptide mit mindestens 50 % Homologie zu der Sequenz
kodiert, die die Aminosäuresequenzen in SEQ ID NO:2
kodiert, wobei die Sequenz als C₁₆- oder C₁₈-Elongase
25 wirkt.
3. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 2, wobei die
Sequenz von einem Oomyzet stammt.
- 30 4. Isolierte Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 2 oder
Anspruch 3, wobei die Sequenz von der Gattung Phytophthora
stammt.
5. Aminosäuresequenz, die von einer isolierten Nukleinsäure-
35 sequenz nach einem der Ansprüche 2 bis 4 stammt.
6. Genkonstrukt, umfassend eine isolierte Nukleinsäure nach
einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Nukleinsäure funkti-
onsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbun-
40 den ist.
7. Genkonstrukt nach Anspruch 6, dessen Genexpression durch
die Regulationssignale verstärkt wird.

82

8. Vektor, umfassend eine Nukleinsäure nach Anspruch 2 oder ein Genkonstrukt nach Anspruch 6.
- 5 9. Organismus, umfassend mindestens eine Nukleinsäure nach Anspruch 2, ein Genkonstrukt nach Anspruch 6 oder einen Vektor nach Anspruch 8.
- 10 10. Organismus nach Anspruch 9, wobei der Organismus ein Mikroorganismus, ein nicht-humanes Tier oder eine Pflanze ist.
11. Organismus nach Anspruch 9 oder 10, wobei der Organismus eine transgene Pflanze ist.
- 15 12. Verfahren zur Herstellung von PUFAs, wobei das Verfahren das Züchten eines Organismus umfasst, der eine Nukleinsäure nach Anspruch 2, ein Genkonstrukt nach Anspruch 6 oder einen Vektor nach Anspruch 8 umfasst, kodierend ein Polypeptid, das C₁₈-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül um mindestens zwei Kohlenstoffatome unter 20 Bedingungen verlängert, unter denen PUFAs in dem Organismus gebildet werden.
- 25 13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die durch das Verfahren hergestellten PUFAs C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül sind.
- 30 14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die C₂₀- oder C₂₂-Fettsäuremoleküle aus dem Organismus in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure isoliert werden.
- 35 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei der Organismus ein Mikroorganismus, ein Tier oder eine Pflanze ist.
- 40 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei der Organismus eine transgene Pflanze ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 16, wobei die C₁₈-Fettsäure eine Fettsäure mit drei Doppelbindungen im Molekül ist.
- 45 18. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, hergestellt durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 17.

83

19. Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs umfasst und von transgenen Pflanzen stammt.
20. Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung nach Anspruch 19, wobei die PUFAs von transgenen Pflanzen stammen, welche eine Nukleotidsequenz nach Anspruch 2 umfassen.
21. Verwendung der Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

10

15

20

25

30

35

40

45

1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH

<120> Neues Elongasegen und Verfahren zur Herstellung
mehrfach ungesättigter Fettsäuren

<130> 925_2001

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1066

<212> DNA

<213> Phytophthora infestans

<220>

<221> CDS

<222> (52)..(888)

<400> 1

```

gaattcggca cgaggttcgc acgtccatcg tctactcacc aacaagaagt c atg tcg      57
                                                Met Ser
                                                1

act gag cta ctg cag agc tac tac gcg tgg gcc aac gcc acg gag gcc      105
Thr Glu Leu Leu Gln Ser Tyr Tyr Ala Trp Ala Asn Ala Thr Glu Ala
      5                                10                                15

aag ctg ctg gac tgg gtc gac cct gag ggc ggc tgg aag gtg cat cct      153
Lys Leu Leu Asp Trp Val Asp Pro Glu Gly Gly Trp Lys Val His Pro
      20                                25                                30

atg gca gac tac ccc cta gcc aac ttc tcc agc gtc tac gcc atc tgc      201
Met Ala Asp Tyr Pro Leu Ala Asn Phe Ser Ser Val Tyr Ala Ile Cys
      35                                40                                45                                50

gtc gga tac ttg ctc ttc gta atc ttc ggc acg gcc ctg atg aaa atg      249
Val Gly Tyr Leu Leu Phe Val Ile Phe Gly Thr Ala Leu Met Lys Met
      55                                60                                65

gga gtc ccc gcc atc aag acc agt cca tta cag ttt gtg tac aac ccc      297
Gly Val Pro Ala Ile Lys Thr Ser Pro Leu Gln Phe Val Tyr Asn Pro
      70                                75                                80

atc caa gtc att gcc tgc tct tat atg tgc gtg gag gcc gcc atc cag      345
Ile Gln Val Ile Ala Cys Ser Tyr Met Cys Val Glu Ala Ala Ile Gln
      85                                90                                95

gcc tac cgc aac ggc tac acc gcc gcc ccg tgc aac gcc ttt aag tcc      393
Ala Tyr Arg Asn Gly Tyr Thr Ala Ala Pro Cys Asn Ala Phe Lys Ser
      100                                105                                110
    
```

2

gac gac ccc gtc atg ggc aac gtt ctg tac ctc ttc tat ctc tcc aag 441
Asp Asp Pro Val Met Gly Asn Val Leu Tyr Leu Phe Tyr Leu Ser Lys
115 120 125 130

atg ctc gac ctg tgc gac aca gtc ttc att atc cta gga aag aag tgg 489
Met Leu Asp Leu Cys Asp Thr Val Phe Ile Ile Leu Gly Lys Lys Trp
135 140 145

aaa cag ctt tcc atc ttg cac gtg tac cac cac ctt acc gtg ctt ttc 537
Lys Gln Leu Ser Ile Leu His Val Tyr His His Leu Thr Val Leu Phe
150 155 160

gtc tac tat gtg acg ttc cgc gcc gct cag gac ggg gac tca tat gct 585
Val Tyr Tyr Val Thr Phe Arg Ala Ala Gln Asp Gly Asp Ser Tyr Ala
165 170 175

acc atc gtg ctc aac ggc ttc gtg cac acc atc atg tac act tac tac 633
Thr Ile Val Leu Asn Gly Phe Val His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr
180 185 190

ttc gtc agc gcc cac acg cgc aac att tgg tgg aag aag tac ctc acg 681
Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asn Ile Trp Trp Lys Lys Tyr Leu Thr
195 200 205 210

cgc att cag ctt atc cag ttc gtg acc atg aac gtg cag ggc tac ctg 729
Arg Ile Gln Leu Ile Gln Phe Val Thr Met Asn Val Gln Gly Tyr Leu
215 220 225

acc tac tct cga cag tgc cca ggc atg cct cct aag gtg ccg ctc atg 777
Thr Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly Met Pro Pro Lys Val Pro Leu Met
230 235 240

tac ctt gtg tac gtg cag tca ctc ttc tgg ctc ttc atg aat ttc tac 825
Tyr Leu Val Tyr Val Gln Ser Leu Phe Trp Leu Phe Met Asn Phe Tyr
245 250 255

att cgc gcg tac gtg ttc ggc ccc aag aaa ccg gcc gtg gag gaa tcg 873
Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro Lys Lys Pro Ala Val Glu Glu Ser
260 265 270

aag aag aag ttg taa cggcgcttgt taaaaagtct aacctcgctg taacagctta 928
Lys Lys Lys Leu
275

aaacacacac acacacaacg cttttagtagag gaggtaagta gtggcaactc gtgtagaaat 988

gcagcatgcc catcaaatac atcccgtatg attcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1048

aaaaaaaaaa aactcgag 1066

<210> 2
<211> 278
<212> PRT
<213> *Phytophthora infestans*

3

<400> 2

Met Ser Thr Glu Leu Leu Gln Ser Tyr Tyr Ala Trp Ala Asn Ala Thr
 1 5 10 15
 Glu Ala Lys Leu Leu Asp Trp Val Asp Pro Glu Gly Gly Trp Lys Val
 20 25 30
 His Pro Met Ala Asp Tyr Pro Leu Ala Asn Phe Ser Ser Val Tyr Ala
 35 40 45
 Ile Cys Val Gly Tyr Leu Leu Phe Val Ile Phe Gly Thr Ala Leu Met
 50 55 60
 Lys Met Gly Val Pro Ala Ile Lys Thr Ser Pro Leu Gln Phe Val Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ile Gln Val Ile Ala Cys Ser Tyr Met Cys Val Glu Ala Ala
 85 90 95
 Ile Gln Ala Tyr Arg Asn Gly Tyr Thr Ala Ala Pro Cys Asn Ala Phe
 100 105 110
 Lys Ser Asp Asp Pro Val Met Gly Asn Val Leu Tyr Leu Phe Tyr Leu
 115 120 125
 Ser Lys Met Leu Asp Leu Cys Asp Thr Val Phe Ile Ile Leu Gly Lys
 130 135 140
 Lys Trp Lys Gln Leu Ser Ile Leu His Val Tyr His His Leu Thr Val
 145 150 155 160
 Leu Phe Val Tyr Tyr Val Thr Phe Arg Ala Ala Gln Asp Gly Asp Ser
 165 170 175
 Tyr Ala Thr Ile Val Leu Asn Gly Phe Val His Thr Ile Met Tyr Thr
 180 185 190
 Tyr Tyr Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asn Ile Trp Trp Lys Lys Tyr
 195 200 205
 Leu Thr Arg Ile Gln Leu Ile Gln Phe Val Thr Met Asn Val Gln Gly
 210 215 220
 Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly Met Pro Pro Lys Val Pro
 225 230 235 240
 Leu Met Tyr Leu Val Tyr Val Gln Ser Leu Phe Trp Leu Phe Met Asn
 245 250 255
 Phe Tyr Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro Lys Lys Pro Ala Val Glu
 260 265 270
 Glu Ser Lys Lys Lys Leu
 275