



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 35 162 T2 2007.11.22

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 147 174 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 35 162.6

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US99/28655

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 965 105.2

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2000/034439

(86) PCT-Anmeldetag: 06.12.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 15.06.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 24.10.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 14.02.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 22.11.2007

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12N 1/10 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 15/06 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/30 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

111301 P 07.12.1998 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Washington State University Research  
Foundation, Pullman, Wash., US

(72) Erfinder:

BROWSE, A., John, Palouse, WA 99161, US;  
WALLIS, G., James, Moscow, ID 83843, US;  
WATTS, L., Jennifer, Moscow, ID 83843, US

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen

(54) Bezeichnung: DESATURASEN UND VERFAHREN IHRER ANWENDUNG ZUR SYNTHESE VON MEHRFACH UN-  
GESÄTTIGTEN FETTSÄUREN

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

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

**Beschreibung****Gebiet der Erfindung**

**[0001]** Die Erfindung betrifft Desaturase-Enzyme, die zur Produktion mehrfachungesättigter Fettsäuren mit wichtigen diätischen Anwendungen verwendet werden können.

**Hintergrund**

**[0002]** Fettsäuren sind fundamentale Komponenten lebender Systeme. Sie bilden den größten Anteil zytoplasmatischer Membranen, wie sie in Pflanzen, Tieren und Protisten gleichermaßen vorkommen. Fettsäuren mit zwanzig Kohlenstoffatomen mit mehr als einer ungesättigten Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung entlang der Kohlenwasserstoffkette sind für ihre besondere Bedeutung bekannt. Arachidonat (20:4) (Heinz, Lipid Metabolism in Plants, S. 33-89, 1993; Yamazaki et al., Biochim. Biophys. Acta 1123: 18-26, 1992; Ulsamer et al., J. Cell Biol. 43: 105-114, 1969; and Albert et al., Lipids 14: 498-500, 1979) und Eikosapentaensäure (20:5) (Heinz, Lipid Metabolism in Plants, S. 3389, 1993; Yamazaki et al., Biochim. Biophys. Acta 1123: 18-26, 1992; Ulsamer et al., J. Cell Biol. 43: 105-114, 1969; Albert et al., Lipids 14: 498-500, 1979; and Cook et al., J. Lipid Res. 32: 1265-1273, 1991), gemeinhin auch als EPA bekannt, sind bedeutsame Komponenten der Säugetierzellmembran und gleichfalls Vorläufer von Signalmolekülen einschließlich der Prostaglandine. Bestimmte spezialisierte Säugetiergegewebe wie das Gehirn (Naughton, J. Biochem. 13: 21-32, 1981), Hoden (Wilder and Coniglio, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 177: 399405, 1984), und die Netzhaut (Aveldano de Caldironi et al., Prog. Lipid Res. 20: 49-57, 1981) sind besonders reich an ungesättigten Fettsäuren.

**[0003]** Arachidonate und Eikosapentaensäure fungieren beide als Vorläufer für die Synthese von 22-Kohlenstoff-mehrachungesättigten-Fettsäuren und, mit Di-homo- $\gamma$ -linolensäure (20:3) (Yamazaki et al., Biochim. Biophys. Acta 1123: 18-26, 1992; Ulsamer et al., J. Cell Biol. 43: 105-114, 1969; and Albert et al., Lipids 14: 498-500, 1979), als Vorläufer für die Synthese von Eikosanoid-metabolischen Regulatoren (Hwang, Fatty Acids in Foods and Their Health Implications, 545-557, 1992). Schlüsselenzyme in der Synthese von 20-Kohlenstoff-Fettsäuren sind Desaturasen, die durch Entfernung zweier Wasserstoffatome in bestimmten Positionen längs der aliphatischen Kohlenwasserstoffkette cis-Doppelbindungen einführen. Desaturase-Enzyme sind bezüglich der Position, Anzahl und Stereochemie der bereits in der Zielfettsäure enthaltenen Doppelbindungen spezifisch (Heinz, Lipid Metabolism in Plants, 33-89, 1993).

**[0004]** Um 20-Kohlenstoff-mehrachungesättigte-Fettsäuren synthetisieren zu können, müssen Säugetiere die essentielle Fettsäure 18:2 (Brenner, The Role of Fats in Human Nutrition, S. 45-79, 1989) und 18:3 (Nelson, Fatty Acids in Foods and Their Health Implications, S. 437-471, 1992; Brenner, The Role of Fats in Human Nutrition, S. 45-79, 1989; and Hulanicka et al., J. Biol. Chem. 239: 2778-2787, 1964) aus ihrer Nahrung aufnehmen (Nelson, Fatty Acids in Foods and Their Health Implications, 437-471, 1992). Diese diätischen mehrfachungesättigten Fettsäuren werden im endoplasmatischen Retikulum durch eine Reihe von positionsspezifischen Desaturase- und Malonyl-CoA-abhängigen Kettenverlängerungsschritten ([Fig. 1A](#)) metabolisiert, wodurch das charakteristische Methylenunterbrochene Doppelbindungsmuster entsteht. In der Leber, die das primäre Organ des menschlichen Lipidmetabolismus darstellt, wird der erste Schritt in der Biosynthese von 20-Kohlenstoff-Fettsäuren durchgeführt, nämlich die Desaturierung der essentiellen Fettsäuren in der  $\Delta^6$ -Position. Die Desaturierungsprodukte werden zum 20:3 und 20:4 verlängert (Cook et al., J. Lipid Res. 32: 1265-1273, 1991). Diese 20-Kohlenstoffprodukte werden wiederum von einer  $\Delta^5$ -Desaturase denaturiert, um Arachidonsäure und Eikosapentaensäure zu produzieren. Dieser  $\Delta^6$ -Desaturierungsschritt ist in diesem metabolischen Reaktionsweg geschwindigkeitsbestimmend (Bernet and Sprecher, Biochim. Biophys. Acta 398: 354-363, 1975; and Yamazaki et al., Biochim. Biophys. Acta 1123: 18-26, 1992) und wird nicht überraschender Weise durch die Nahrung und hormonelle Änderungen reguliert (Brenner, The Role of Fats in Human Nutrition, S. 45-79, 1989).

**[0005]** Im Gegensatz zur Leber wurde in einigen Organismen und Geweben ein alternativer Reaktionsweg für die Biosynthese von 20-Kohlenstoff-mehrachungesättigten-Fettsäuren nachgewiesen ([Fig. 1B](#)). An Stelle der Desaturierung ist der erste Schritt im alternativen Reaktionsweg die Verlängerung der essentiellen 18-Kohlenstoff-Fettsäure zu einer 20-Kohlenstoffkettenlänge, wodurch 20:2 (Ulsamer et al., J. Cell Biol. 43: 105-114, 1969; and Albert et al., Lipids 14: 498-500, 1979) und 20:3 hergestellt werden. Die nachfolgende Desaturierung erfolgt über eine  $\Delta^8$ -Desaturase ([Fig. 1](#)). Die Produkte dieser Verlängerungs-Desaturierung, 20:3 und 20:4 sind die gleichen wie beim häufigeren Desaturierungs-Verlängerungsreaktionsweg. Der  $\Delta^8$ -Reaktionsweg kommt in der Erdamoë Acanthamoeba sp. (Ulsamer et al., J. Cell Biol. 43: 105-114, 1969), und in euglenoiden Spezies vor, wo es den überwiegenden Reaktionsweg für die Bildung von 20-Kohlenstoff-mehrachungesättigten-Fett-

säuren darstellt (Hulanicka et al., Journal of Biological Chemistry 239: 2778-2787, 1964). Dieser  $\Delta^8$ -Desaturierungsreaktionsweg findet in Säugetieren statt, und zwar sowohl in Rattenhoden (Albert and Coniglio, Biochem. Biophys. Acta 489: 390-396, 1977) und in menschlichen Hoden (Albert et al., Lipids 14: 498-500, 1979). Während  $\Delta^8$ -Aktivität in Brustkrebszelllinien (Grammatikos et al., Br. J. Cancer 70: 219-227, 1994; and Bardon et al., Cancer Lett. 99: 5158, 1996) und in Gliomen (Cook et al., J. Lipid Res. 32: 1265-1273, 1991) beobachtet wurde, konnte keine  $\Delta^8$ -Aktivität in einer korrespondierenden, nicht kanzerösen Zelllinie (Grammatikos et al., Br. J. Cancer 70: 219-227, 1994) oder im Gehirn (Dhopeshwarkar and Subramanian, J. Neurochem. 36: 1175-1179, 1976) nachgewiesen werden. Die Bedeutung der  $\Delta^8$ -Desaturierung im normalen oder Krebszell-Metabolismus ist unklar, weil die Analyse von Desaturase-Aktivitäten in Säugetiersystemen häufig vom Vorhandensein kompetitiver  $\Delta^6$ -Reaktionen und kettenverkürzenden Retrokonversionen von Fettsäuresubstraten im Gewebe verkompliziert wird (Sprecher and Lee, Biochim. Biophys. Acta 388: 113-125, 1975; Geiger et al., Biochim. Biophys. Acta 1170: 137-142, 1993).

**[0006]** Mehrfachungesättigte 20-Kohlenstoff-Fettsäuren sind aus den oben genannten Gründen für die menschliche Ernährung wichtig und es konnte kürzlich ein bemerkenswertes Interesse daran beobachtet werden, derartige Fettsäuren Säuglingsnahrung, Kleinkindernahrung, diätischen Ergänzungsmitteln und nutrizentrischen Formulierungen beizugeben.

**[0007]** Aus diesem Grund wäre es wünschenswert, neue transgene Pflanzen und Tiere mit einer gesteigerten Fähigkeit zur Produktion von mehrfachungesättigten 20-Kohlenstoff-Fettsäuren zu produzieren. Spychalla et al, PNAS, 94, p1142-1147, 1997, und Sagarova et al, PNAS, 94, p 4211-4216, 1997, beziehen sich beide auf die Klonierung und Charakterisierung eines Genes, das für eine Desaturase kodiert.

#### Zusammenfassung der Offenbarung

**[0008]** Die Erfindung stellt neue Desaturase-Enzyme gemäß den Patentansprüchen bereit, die kloniert und in Zellen von verschiedenen Organismen, einschließlich Pflanzen, exprimiert werden können, um 20-Kohlenstoff-mehrfachungesättigte-Fettsäuren zu produzieren. Die Expression derartiger Fettsäuren erhöht die Nährstoffqualität derartiger Organismen. Beispielsweise können Ölsaftpflanzen so gestaltet werden, daß sie  $\Delta^5$ - und  $\Delta^8$ -Desaturasen gemäß der vorliegenden Erfindung aufweisen. Derartige Ölsaftpflanzen würden Samenölproduzieren, das reich an mehrfachungesättigten 20:3, 20:4, 20:5, 22:4 und 22:5 Fettsäuren wäre. Solchen Fettsäuren könnten nützlicher Weise in Säuglingsnahrung, Nahrung aller Arten, diätischer Zusatzstoffe, sowie nutrizentrischer und pharmazeutischer Zusammensetzungen aufgenommen werden.

**[0009]** Die Erfindung stellt weiterhin beanspruchte Proteine bereit, die sich von den Proteinen der [Fig. 6A](#) und [Fig. 7A](#) durch Substitution einer oder mehrerer konservierter Aminosäuren unterscheiden. Ebenso werden Proteine bereitgestellt, die zu den Proteinen der [Fig. 6A](#) und [Fig. 7A](#) „wesentliche Ähnlichkeit“ (definiert in Abschnitt „Definitionen“) aufweisen.

**[0010]** Die Erfindung stellte beanspruchte isolierte neue Nukleinsäuren bereit, die für die oben genannten Proteine kodieren, rekombinante Nukleinsäuren, die derartige Nukleinsäuren aufweisen, sowie Zellen und Pflanzen und Organismen, die solche rekombinanten Nukleinsäuren enthalten.

**[0011]** Die neuartigen Desaturase-Enzyme können einzeln oder gemeinsam, beispielsweise in einem metabolischen Reaktionsweg, verwendet werden, um mehrfachungesättigte Fettsäuren, wie 20:3, 20:4, 20:5, 22:4 und 22:5 Fettsäuren, zu produzieren.

**[0012]** Die vorliegende Erfindung umfaßt auch Abschnitte von Nukleinsäuren, die für die neuartigen Enzyme kodieren, Abschnitte von Nukleinsäuren, die für Polypeptide kodieren, die im Wesentlichen zu diesen neuen Enzymen ähnlich sind und Abschnitte von Nukleinsäuren, die für Polypeptide kodieren, die sich durch Substitution einer oder mehrerer konservierter Aminosäuren von den Proteinen gemäß [Fig. 6A](#) und [Fig. 7A](#) unterscheiden. Solche Abschnitte von Nukleinsäuren können beispielsweise als Primer und Sonden für wissenschaftliche und diagnostische Zwecke verwendet werden. Die wissenschaftlichen Verwendungen für derartigen Sonden und Primer schließt die Identifikation und Klonierung von ähnlichen  $\Delta^5$ - und  $\Delta^8$ -Desaturasen in anderen Organismen, einschließlich Menschen mit ein.

**[0013]** Die Erfindung umfaßt weiterhin Verfahren, die die Desaturase-Enzyme der Erfindung verwenden. Ein Beispiel für diese Ausgestaltung der Erfindung ist eine Hefe- oder Pflanzenzelle, die Gene für eine oder beide Desaturasen der vorliegenden Erfindung aufweist und die, unter Mitwirkung weiterer Desaturasen, zur Produktion von Arachidonsäure und/oder EPA in der Lage ist.

## Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0014] [Fig. 1A](#) zeigt einen häufig vorkommenden Weg zur Synthese von 20-Kohlenstoff-mehrfachungesättigte-Fettsäuren, der mit der  $\Delta^6$ -Desaturasen von 18-Kohlenstoff-Fettsäuren beginnt, gefolgt von einer 2-Kohlenstoff-Verlängerung sowie weiterer Desaturierung und Verlängerung.

[0015] [Fig. 1B](#) zeigt einen alternativen Reaktionsweg, der mit der Verlängerung von 18-Kohlenstoff-Fettsäuren zu 20-Kohlenstoff-Fettsäuren beginnt, gefolgt von einer  $\Delta^8$ -Desaturierung und einer zweiten Desaturierung an der  $\Delta^5$ -Position.

[0016] [Fig. 1C](#) zeigt einen alternativen Reaktionsweg für die Synthese von mehrfachungesättigten Fettsäuren unter Verwendung von  $\Delta^5$ -,  $\Delta^6$ - und  $\Delta^8$ -Desaturasen zur Produktion von Arachidonsäure und EPA.

[0017] [Fig. 2](#) zeigt eine gaschromatographische (GC) Analyse von Fettsäuremethylester aus *E. gracilis*, der im Dunkeln mit Saccharose als Kohlenstoffquelle gezüchtet (heterotroph) wurde. Die Fettsäuren wurden Vergleich der Retentionszeiten mit bekannten Standards identifiziert. Signifikante Peaks sind numeriert und mit ihren Retentionszeiten und Verhältnissen der Gesamtfettsäure verzeichnet.

[0018] [Fig. 3](#) zeigt Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenz zwischen dem Euglena  $\Delta^8$ -Desaturase-Protein (EFD1) und den Desaturase-Enzymen von *C. elegans*. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des EFD1-Gens zeigt Ähnlichkeit mit der *C. elegans*  $\Delta^6$ -(FAT3) und  $\Delta^5$ -(FAT4) Desaturasen (Napier et al., Biochem. J. 330: 611-614, 1998). Die Ähnlichkeit ist in Regionen konservierter Funktion am größten. Aminosäuren, die eine Zytochrom b<sub>5</sub>-ähnliche Domäne im N-terminalen Bereich darstellen (Lederer, Biochemie 76: 674-692, 1994), sind angegeben. Die durch unterstrichene Buchstaben angegebenen His-Box-Motive sind auch in anderen identifizierten Membran-Desaturasen vorhanden (Napier et al., Biochem. J. 330: 611-614, 1998; Michaelson et al., J. Biol. Chem. 273: 19055-19059, 1998; and Shanklin and Cahoon, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 611-641, 1998).

[0019] [Fig. 4](#) zeigt das Ergebnis einer gaschromatographischen Untersuchung von Fettsäure-Methylestern aus rekombinanter Hefe. Hefekulturen entweder Kontroll-pYES2 oder pYES2-541 von dem das Euglena  $\Delta^8$ -Desaturase (EFD1) Gen exprimiert wird, wurden mit den angegebenen Kohlenstoff-Fettsäuren ergänzt. Der Kontrollstamm desaturiert exogene Fettsäuren nicht. Für den experimentellen Stamm zeigt ein Pfeil den Desaturierungs-Peak an.

[0020] [Fig. 5](#) zeigt die Ergebnisse einer Massenspektroskopie (MS) von Desaturierungs-Produkten. DMOX Derivate von EFD1 Desaturierungs-Produkten wurden durch GC-Massenspektroskopie analysiert. Das Molekül-Ion jeder Fettsäure ist 2 a.m.u. (Atomare Massen Einheiten) geringer als das Substrat, wie es für das Einfügen einer Doppelbindung auch zu erwarten ist. Die Desaturierung an der  $\Delta^8$ -Position wird durch charakteristische m/z Peaks von 182 und 194 für jedes Produkt bewiesen, angezeigt durch die eckige Klammer.

[0021] [Fig. 6A](#) zeigt die primäre Aminosäuresequenz der Fettsäure  $\Delta^5$ -Desaturase von *Caenorhabditis elegans*.

[0022] [Fig. 6B](#) zeigt eine Nukleotidsequenz einschließlich des ORF (offenen Leserahmens), der für die Fettsäure  $\Delta^5$ -Desaturase von *Caenorhabditis elegans* kodiert.

[0023] [Fig. 7A](#) zeigt die primäre Aminosäuresequenz der Fettsäure  $\Delta^8$ -Desaturase des Protisten *Euglena gracilis*.

[0024] [Fig. 7B](#) zeigt eine Nukleotidsequenz einschließlich des ORF, der für die  $\Delta^8$ -Desaturase des Protisten *Euglena gracilis* kodiert.

[0025] [Fig. 8](#) zeigt bestimmte Strukturmerkmale der *C. elegans*  $\Delta^5$ - und  $\Delta^6$ -Desaturasegene. Die relative Position der Genprodukte T13F2.1 und W08D2.4 auf ihrem jeweiligen Kosmid sind oben gezeigt. Die Exon-Struktur von T13F2.1 ( FAT4) und W08D2.4 ( FAT3), die die Stelle der Sequenzen der SL1 Spleißstelle, des Häm-Bindungsmotives von Zytochrom b<sub>5</sub> (cyt b<sub>5</sub>) und den drei konservierten Histidin-Box-Motiven (HBX) zeigen, sind darunter angegeben.

[0026] [Fig. 9](#) zeigt einen Vergleich der vorhergesagten Aminosäuresequenzen der Borretsch  $\Delta^6$ -Desaturase (bord6), der *C. elegans* FAT3 (fat3), *C. elegans* FAT4 (fat4) und der *Mortirella alpina*  $\Delta^5$ -(mord5) Desaturase.

Identische und/oder konservierte Positionen sind schattiert und die konservierte HPGG Häm-Bindungsdomäne und die konservierten Histidin-Boxes sind unterstrichen.

**[0027]** Abkürzungen: bord6 = Borago officinalis  $\Delta^6$ -Desaturase (Gen-Bank Zugangsnummer U79010); fat4 = C. elegans FAT4 Desaturase; fat3 = C. elegans  $\Delta^6$ -Desaturasesequenz von W08D2.4 (Gen-Bank Zugangsnummer Z70271), ediert auf der Basis der cDNA Sequenz, um die Aminosäuren 38-67 zu entfernen; mord5 = Mortierella alpina  $\Delta^5$ -Desaturase (Gen-Bank Zugangsnummer AF054824).

**[0028]** Die [Fig. 10A](#)-[Fig. 10C](#) zeigen die Identifizierung von Arachidonsäure in transgener Hefe durch Gas-chromatographie – Massenspektroskopie (GC-MS). Fettsäuremethylester von Gesamt fetten von S. cerevisiae, die für 16 Stunden unter induzierenden Bedingungen (2% Galactose) unter Zusatz von 0,2 mmol/l Di-homo- $\gamma$ -linolensäure gezüchtet wurde, wurde durch GC-MS analysiert. (A) Mit dem (leeren) Vektor pYES2 transformierte Hefe. (B) Mit dem pYES2 Vektor, enthaltend fat4, transformierte Hefe. Die gemeinsamen Peaks wurden identifiziert als: 16:0 (11.19-11.12 min.), 16:1 (11.38 min.), 18:0 (13.07-13.08 min.), 18:1 (13.29 min.), 20:3 (11.64-11.65 min.). Die neuen Peaks sind Arachidonsäure (14.49 min.) und 18:2 (12.91 min.). (C) Das Massenspektrum des Peaks, der bei 14.49 min. eluiert. Dieses Spektrum ist von dem der authentischen Methyl-Arachidonsäure nicht unterscheidbar.

**[0029]** [Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#) zeigen die neuen Desaturierungsprodukte von Substraten ohne eine  $\Delta^8$ -Doppelbindung. (A) Partielle GC-Spur von Fettsäuremethylestern, abgeleitet aus Hefen, die die fat4  $\Delta^5$ -Dasaturase ergänzt mit 20:2  $\Delta^{11,14}$  (14.81 min.) exprimieren. Das Desaturierungsprodukt dieses Substrates eluiert bei 14.62 min. und wurde identifiziert als 20:3  $\Delta^{5,11,14}$ . (B) Partielle GC-Spur von Hefe exprimierend die fat4  $\Delta^5$ -Desaturase ergänzt mit 20:3  $\Delta^{11,14,17}$  14.87 min.). Das Desaturierungsprodukt dieses Substrates eluiert bei 14.69 min. und wurde als 20:4  $\Delta^{5,11,14,17}$  identifiziert.

**[0030]** [Fig. 12](#) ist eine Tabelle, in der die Substratspezifitäten von C. elegans  $\Delta^5$ - und  $\Delta^6$ -Desaturase verglichen werden.

**[0031]** [Fig. 13](#) ist eine Tabelle, in der die Aufnahme und Desaturierung von Fettsäuren durch Hefestämme, die mit entweder einem Kontrollkonstrukt pYES oder mit pYES-541, einem Klon enthaltend das E. gracilis  $\Delta^8$ -Desaturasegen EGD1 transformiert wurden. S. cerevisiae-Stämme enthalten einen Kontrollvektor (pYES) oder exprimierend EFD1 (pYES-541) wurden in Gegenwart der genannten Fettsäure kultiviert. Die Kulturen wurden geerntet, gewaschen und Methylester wurden von der Gesamtzahl der Zellen hergestellt und durch GC analysiert. Die Gewichts-% der Gesamt fettsäuremethylester ist angegeben.

#### Auflistung der Sequenzen

**[0032]** Die aufgelisteten Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen sind unter Verwendung der standardmäßigen Buchstabenabkürzungen für Nukleotidbasen und des Drei-Buchstabencodes für Aminosäuren in der beigefügten Auflistung der Sequenzen gezeigt. Es ist jeweils nur ein Strang der Nukleinsäuresequenz gezeigt, aber der jeweils komplementäre Strang soll eingeschlossen sein durch Verweis auf den gezeigten Strang. SEQ ID NO: 1 ist die Nukleotidsequenz, die zum offenen Leserahmen der Fettsäure  $\Delta^5$ -Desaturase von Caenorhabditis elegans korrespondiert.

SEQ ID NO: 2 ist die primäre Aminosäuresequenz der Fettsäure  $\Delta^5$ -Desaturase von Caenorhabditis elegans. SEQ ID NO: 3 ist die Nukleotidsequenz, die zum offenen Leserahmen der Fettsäure  $\Delta^8$ -Desaturase des Protisten Euglena gracilis korrespondiert.

SEQ ID NO: 4 ist die primäre Aminosäuresequenz der Fettsäure  $\Delta^8$ -Desaturase des Protisten Euglena gracilis. SEQ ID NOs: 5-8 sind Primer, die zur Amplifizierung und Klonierung der die  $\Delta^8$ -Desaturase kodierenden Nukleinsäuresequenz verwendet wurden.

SEQ ID NO: 9 ist ein Polyadenylierungssignal.

SEQ ID NO: 10 ist ein Primer, der zur Amplifizierung und Klonierung der für die  $\Delta^5$ -Desaturase kodierenden Nukleinsäuresequenz verwendet wurde.

SEQ ID NO: 11 ist eine kurze RNA „leader“ Sequenz.

SEQ ID NO: 12 ist die Aminosäuresequenz eines Histidin-Box-Motivs.

SEQ ID NO: 13 ist die Aminosäuresequenz eines Histidin-Box-Motivs.

#### Beschreibung der Erfindung

**[0033]** Die folgenden Definitionen und Verfahren werden bereitgestellt, um die vorliegende Erfindung besser zu definieren und dem Fachmann für die Ausführung der vorliegenden Erfindung Hilfestellung zu geben.

**[0034]** Sofern nicht anders beschrieben, sollen die Begriffe gemäß der von Fachmann verwendeten gewöhnlichen Verwendung verstanden werden. Definitionen von gewöhnlichen Begriffen der Molekularbiologie können auch gefunden werden in Rieger et al., *Glossary of Genetics : Classical and Molecular*, Sth edition, Springer-Verlag: New York, 1991; und Lewin, *Genes VI*, Oxford University Press: New York, 1997. Die Nomenklatur für DNA-Basen gemäß 37 C. F. R. 1.822 wird vorliegend verwendet. Die standardmäßige Ein- und Drei-Buchstabennomenklatur für Aminosäuren wird verwendet.

#### Definitionen

**[0035]** Abschnitt: Ein Abschnitt eines Nukleinsäuremoleküls ist ein Bereich benachbarter Nukleinsäuren, der zu einer Sequenz dieses Moleküls korrespondiert, das etwa 15, 20, 30, 40, 50 oder 60 Nukleinsäuren lang ist. Solche Nukleotid-Abschnitte können als Sonden oder Primer verwendet werden.

**[0036]** Ein Abschnitt eines Proteins ist ein Bereich benachbarter Aminosäuren, die zur Aminosäuresequenz des Proteins korrespondieren, das ungefähr 5, 10, 20, 30, 40 oder 50 Reste lang ist. Gemäß der hierin praktizierten Verwendung kann solch ein Abschnitt zu jedem Segment eines Nukleinsäuremoleküls korrespondieren, beispielsweise kann solch ein Abschnitt zu einem Segment bestehend aus Nukleotiden 1 bis 500, 501 bis 1000 oder 10001 bis 1451 der in **Fig. 6D** gezeigten Sequenz oder Nukleotiden 1 bis 400, 401 bis 800, 801 bis 1251 der in **Fig. 7B** gezeigten Sequenz korrespondieren.

**[0037]** Desaturase: Eine Desaturase ist ein Enzym, das die Bildung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen in einem Kohlenwasserstoffmolekül begünstigt.

**[0038]** Desaturase-Aktivität kann in Versuchen dadurch demonstriert werden, daß eine Präparation enthaltend ein Enzym mit einem Fettsäuresubstrat in tauglicher Form inkubiert wird und bezüglich der Umwandlung dieses Substrates zum vorausgesagten Fettsäureprodukt analysiert wird. Alternativ dazu kann eine DNA-Sequenz, die vermutlich für ein Desaturase-Protein kodiert, in ein entsprechendes Vektor-Konstrukt eingebaut werden und dadurch in Zellen, die normalerweise nicht über die Fähigkeit zur Desaturierung eines bestimmten Fettsäuresubstrates verfügen, exprimiert werden. Die Aktivität des Desaturase-Enzyms, das von der DNA-Sequenz kodiert wird, kann dann durch Bereitstellung eines Fettsäuresubstrates in geeigneter Form für solche Zellen demonstriert werden, die mit einem Vektor enthaltend die Desaturase-kodierende DNA-Sequenz im Vergleich zu geeigneten Kontrollzellen (beispielsweise, solchen, die mit dem leeren Vektor transformiert worden sind). In solch einem Experiment belegt die Detektion des vorhergesagten Fettsäureproduktes in Zellen mit der Desaturase-kodierenden DNA-Sequenz und nicht in den Kontrollzellen die Desaturase-Aktivität. Beispiele für diesen Versuchstyp sind beispielsweise beschrieben worden in Lee et al., *Science* 280: 915-918, 1998; Napier et al., *Biochem. J.* 330: 611-614, 1998; und Michaelson et al., *J. Biol. Chem.* 273: 19055-19059, 1998, die hierdurch unter Bezugnahme inkorporiert werden.

**[0039]** Die  $\Delta^5$ -Desaturase-Aktivität kann durch diese Techniken beispielsweise unter Verwendung von 20:3  $\Delta^{8,11,14}$  als Substrat und Nachweis von 20:4  $\Delta^{5,8,11,14}$  als Produkt (Michaelson et al., *J. Biol. Chem.* 273: 19005-19059, 1998) nachgewiesen werden. Andere potentielle Substrate für die Verwendung in  $\Delta^5$ -Aktivitätsversuchen beinhalten, sind jedoch nicht darauf beschränkt, 10:2  $\Delta^{11,14}$  (mit 20:5  $\Delta^{5,11,14}$  als Produkt) und 20:3  $\Delta^{11,14,12}$  (mit 20:4  $\Delta^{5,11,14,17}$  als Produkt).

**[0040]** Die  $\Delta^8$ -Desaturase kann mittels ähnlicher Techniken nachgewiesen werden, beispielsweise von 20:3  $\Delta^{11,14,17}$  als Substrat und Nachweis von 20:4  $\Delta^{8,11,14,17}$  als Produkt.

**[0041]** ORF: Offener Leserahmen. Ein ORF ist eine zusammenhängende Serie von Nukleotidtriplets, die für eine Aminosäure kodieren. Diese Sequenzen sind normalerweise in ein Peptid transferierbar.

**[0042]** Homologe: Zwei Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen, die eine gemeinsame Vorläufersequenz aufweisen und divergierten, als eine Spezies mit dieser Vorläufersequenz sich in zwei Spezies aufteilte. Homologe zeigen häufig einen substantiellen Grad an Sequenzidentität.

**[0043]** Transformiert: Eine transformierte Zelle ist eine Zelle, in die mittels molekularbiologischer Techniken ein Nukleinsäuremolekül eingeführt worden ist. Der Begriff umfaßt alle Techniken, durch die ein Nukleinsäuremolekül in eine derartige Zelle eingeführt werden kann, einschließlich der Transfektion mit viralen Vektoren, der Transformation mit Plasmid-Vektoren und die Einführung nackter DNA durch Elektroporation, Lipofektion und sogenannter „particle gun acceleration“.

**[0044]** Gereinigt: Der Begriff „gereinigt“ bezieht sich nicht notwendigerweise auf absolute Reinheit; stattdessen hat der Begriff relative Bedeutung. So ist beispielsweise eine gereinigte Proteinpräparation eine Präparation, in der das interessierende Protein oder eine andere Substanz in reinerer Form vorliegt, als in seiner natürlichen Umgebung in einer Zelle. Gewöhnlicherweise wird eine Proteinpräparation so gereinigt, daß das Protein mindestens 50 % des Gesamtproteingehaltes der Präparation ausmacht.

**[0045]** Operativ Verbunden: Eine erste Nukleinsäuresequenz ist operativ mit einer zweiten Nukleinsäuresequenz verbunden, wenn die erste Nukleinsäuresequenz in einer funktionalen Beziehung mit der zweiten Nukleinsäuresequenz steht. So ist beispielsweise ein Promotor mit einer kodierenden Sequenz operativ verbunden, wenn der Promotor die Transkription oder Expression des kodierenden Gens beeinflußt. Gewöhnlicherweise sind operativ verbundene DNA-Sequenzen benachbart und sofern notwendig, so angeordnet, daß zwei proteinkodierende Regionen im selben Leserahmen verbunden werden. Sofern Introns vorhanden sind, können die operativ verbundenen DNA-Sequenzen auch nicht-kontinuierlich sein.

**[0046]** Zelle: Eine Pflanzen-, Tier-, Protisten-, Bakterien- oder Pilzzelle.

**[0047]** Sequenz-Ähnlichkeit: Die Ähnlichkeit zwischen zwei Nukleinsäuren oder zwei Aminosäuresequenzen wird in %-Sequenz-Identität ausgedrückt. Je höher die Sequenzidentität zwischen zwei Sequenzen ist, desto ähnlicher sind diese zwei Sequenzen.

**[0048]** Im Fall von Sequenzvergleichen von Proteinen wird Ähnlichkeit nicht nur in %-Identität, sondern es werden auch Substitutionen konservierter Aminosäuren mit einbezogen. Derartige konservative Substitutionen behalten gewöhnlicher Weise die Hydrophobizität und Acidität der substituierten Rest bei, wodurch die Struktur (und damit die Funktion) des gefalteten Proteins beibehalten wird. Die Computerprogramme, die zur Berechnung der Proteinähnlichkeit verwendet werden, verwenden standardisierte Algorithmen, die, wenn sie mit standardisierten Einstellungen verwendet werden, den Vergleich von Ähnlichkeit zwischen verschiedenen Paaren von Proteinen erlauben.

**[0049]** Sequenzen werden mit zugewiesenen Werten für Lücken gegenübergestellt („aligned“) und Identitätsregionen werden mittels eines computerisierten Algorithmus quantifiziert. Vorgegebene Parameter des Computerprogramms werden gewöhnlicher Weise verwendet, um Werte für Lücken und andere Variablen vorzugeben.

**[0050]** Verfahren zur Gegenüberstellung von Sequenzen für deren Vergleich sind bereits weit verbreitet. Verschiedene Programme und Gegenüberstellungsalgorithmen werden von Pearson et al., Methods in Molecular Biology 24: 307-331, 1994, und in Altschul et al., Nature Genet. 6: 119-129, 1994 beschrieben. Altschul et al. stellt eine detaillierte Beurteilung von Sequenzgegenüberstellungsverfahren und Homologieberechnungen vor.

**[0051]** Das NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST TM) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990) ist vor verschiedenen Quellen verfügbar, einschließlich des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) und dem Internet zur Verwendung im Zusammenhang mit den Sequenzanalyseprogrammen blastp, blastn, blastx, tblastn and tblastx. BLAST™ kann unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> aufgerufen werden. Eine Beschreibung, wie die Sequenzidentität zu bestimmen ist, ist im Internet erhältlich. Sequenzidentität, wie hierin beschreiben, wurde mit der BLAST™-Software unter Verwendung der voreingestellten Parameter bestimmt. So kann beispielsweise die blastn (Version 2.0) Software zur Bestimmung der Sequenzidentität zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen unter Verwendung der voreingestellten Parameter (expect = 10, Matrix = BLOSUM62, Filter = DUST (Tatusov and Lipmann, in Vorbereitung für 1. Dezember 1999; und Hancock and Armstrong, Comput. Appl. Biosci. 10: 67-70, 1994) Lücken (gap existence cost) = 11, gap cost pro Rest = 1, und Lambda Koeffizient = 0.85) verwendet werden. Für den Vergleich zweier Polypeptide kann die blastp (Version 2.0) Software mit den voreingestellten Parametern (expect 10, Filter = SEG (Wootton and Federhen, Computers in Chemistry 17: 149-163, 1993), Matrix = BLOSUM62, Lücken (gap existence cost) = 11, gap cost pro Rest = 1, Lambda = 0.85) verwendet werden.

**[0052]** Wenn kurze Peptide gegenübergestellt werden (weniger als ca. 30 Aminosäuren) sollte die Gegenüberstellung unter Verwendung der BLAST-2-Sequenzfunktion vorgenommen werden, wobei das PAM30 Matrixset dem voreingestellten Parametern (open gap 9, extension gap 1 penalties) verwendet wird.

**[0053]** Ein alternatives Gegenüberstellungswerkzeug ist das ALIGN Global Optimal Alignment tool (Version 3.0), erhältlich von Biology Workbench unter der Adresse <http://biology.ncsa.uiuc.edu>. Dieses Werkzeug kann unter Verwendung der voreingestellten Parameter zur Gegenüberstellung zweier bekannter Sequenzen ver-

wendet werden. Referenzen für dieses Werkzeug schließt Meyers and Miller, CABIOS 4: 11-17, 1989 ein.

**[0054]** Konservative Aminosäuresubstitutionen sind solche Substitutionen, die am wenigsten mit den Eigenschaften des ursprünglichen Proteins interferieren, das heißt, die Struktur und im Besonderen die Funktion des Proteins wird beibehalten und nicht durch derartige Substitutionen signifikant verändert. Die Tabelle zeigt Aminosäuren, die für eine ursprüngliche Aminosäure im Protein und die als konservative Substitutionen angesehen werden.

Tabelle 1

Ursprünglicher Rest	Konservative Substitutionen
ala	ser
arg	lys
asn	gin; his
asp	glu

cys	ser
gin	asn
glu	asp
gly	pro
his	asn; gin
ile	leu; val
leu	ile ; val
lys	arg; gin; glu
met	leu; ile
phe	met; leu; tyr
ser	thr
thr	ser
trp	tyr
tyr	trp; phe
val	ile; leu

**[0055]** Durch konservative Substitutionen werden im Allgemeinen (a) die Struktur des Polypeptidrückgrats in der Gegend der Substitution, beispielsweise als „Sheet“ oder „Helikaler Konformation“, (b) die Ladung oder Hydrophobizität des Moleküls an der Zielstelle oder (c) der Raumbedarf der Seitenketten beibehalten.

**[0056]** Die Substitutionen, von denen man im Allgemeinen erwarten kann, daß es sie die größten Veränderungen in den Proteineigenschaften hervorrufen, sind nicht-konservative Änderungen, beispielsweise Änderungen, in denen (a) ein hydrophiler Rest, beispielsweise Seryl oder Threonyl durch einen hydrophoben Rest substituiert wird, beispielsweise Leuzyl, Isoleuzyl, Phenylalanyl, Valyl oder Alanyl; (b) ein Cystein oder Prolin von jedem anderen Rest substituiert wird; (c) ein Rest mit einer elektropositiven Seitenkette, beispielsweise Lysyl, Arginyl, oder Histadyl, durch einen elektronegativen Rest, beispielsweise Glutamyl oder Aspartyl substituiert wird; oder (d) ein Rest mit einer raumgreifenden Seitenkette, beispielsweise Phenylalanin, durch einen

Rest ohne Seitenkette, beispielsweise Glycin substituiert wird.

**[0057]** Sonde: Eine isolierte Nukleinsäure, die mit einer detektierbaren Markierung oder einem Reportermolekül verbunden ist. Typische Markierungen umfassen radioaktive Isotopen, Liganten, chemilumineszente Agenzien und Enzyme.

**[0058]** Primer: Kurze Nukleinsäuren bevorzugt DNA-oligonukleotide mit zehn oder weniger Nukleotiden, die zu einem komplimentären Ziel-DNA-Strang durch Nukleinsäure-Hybridisierung hybridisierbar sind, um ein Hybrid zwischen Primer und Ziel-DNA-Strang herzustellen, und dann entlang des Ziel-DNA-Stranges von einem DNA-Polymeraseenzym verlängert werden kann. Primerpaare können zur Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen verwendet werden, beispielsweise durch die polymerase Kettenreaktion (PCR) oder andere Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren, die im Stand der Technik bekannt sind.

**[0059]** Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Sonden und Primer umfassen typischerweise mindestens 15 kontinuierliche Nukleotide. Um die Spezifität zu erhöhen, können auch längere Sonden und Primer verwendet, so wie Sonden und Primer, die mindestens, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 oder 150 fortlaufende Nukleotide umfassen, die ein definiertes Level an Sequenzidentität mit einem der offebarten Sequenzen zeigen, beispielsweise mindestens 50 %ige, 60 %ige, 70 %ige, 80 %ige, 90 %ige, oder 95 %ige Sequenzidentität.

**[0060]** Derartige Sonden und Primer können alternativer Weise auch solche Nukleotid-Moleküle sein, die unter spezifischen Bedingungen hybridisieren und unter spezifischen Waschbedingungen, wie den weiter unten angegebenen, auch hybridisiert bleiben. Diese Bedingungen können zur Identifizierung von Varianten der Desaturasen verwendet werden. Nukleinsäure-Moleküle, die von der Desaturase cDNA und Gensequenzen abgeleitet sind, schließen Moleküle ein, die unter verschiedenen Bedingungen zu den offebarten Desaturase-Nukleinsäure-Molekülen oder deren Fragmenten hybridisieren. Allgemein werden Hybridisierungsbedingungen in Kategorien klassifiziert, beispielsweise sehr hohe Stringenz, hohe Stringenz und geringe Stringenz. Die Bedingungen für Sonden von ungefähr 600 Basenpaaren oder mehr in Länge sind unten in drei korrespondierenden Kategorien angegeben.

Sehr hohe Stringenz (Detektierte Sequenzen mit 90 % Sequenzidentität)

Hybridisierung	in	SSC	bei	65°C	16 Stunden
zweimaliges Waschen	in	SSC	bei	Raumtemperatur	jeweils 15 Minuten
zweimaliges Waschen	in	SSC	bei	65°C	jeweils 20 Minuten

Hohe Stringenz (Detektierte Sequenzen mit 80 % Sequenzidentität)

Hybridisierung	in	SSC	bei	65°C – 70°C	16-20 Stunden
zweimaliges Waschen	in	SSC	bei	Raumtemperatur	jeweils 5-20 Minuten
zweimaliges Waschen	in	SSC	bei	55°C – 70°C	jeweils 30 Minuten

Geringe Stringenz (Detektiert Sequenzen mit mehr als 50 % Sequenzidentität)

Hybridisierung	in	SSC	bei	65°C – 70°C	16-20 Stunden
Mindestens zweimaliges Waschen	in	SSC	bei	Raumtemperatur	Jeweils 5-20 Minuten

**[0061]** Verfahren zur Herstellung und Verwendung von Sonden und Primern sind in Referenzen angegeben, beispielsweise in Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Labo-

ratory Press, NY, 1989; Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences, 1987; und Innis et al., PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., San Diego, California. 1990. PCR-Primer können von einer bekannten Sequenz abgeleitet werden, beispielsweise unter Verwendung von Computerprogrammen für solche Zwecke, wie beispielsweise Primer (Version 0.5, 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA).

**[0062]** Rekombinante Nukleinsäure: Eine Sequenz, die natürlicherweise nicht vorkommt oder mit einer Sequenz, die durch künstliche Verbindung zweier sonst getrennter Sequenzsegmente generiert wurde. Diese künstliche Kombination wird häufig durch chemische Synthese erreicht, beziehungsweise häufiger durch die künstliche Manipulation von isolierten Segmenten von Nukleinsäuren, beispielsweise durch Techniken des Genetic Engineering, wie die beschrieben in Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989. Der Begriff „Rekombinant“ schließt Nukleinsäuren ein, die lediglich durch Addition, Substitution oder Deletion eines Nukleinsäureabschnitts verändert wurden.

**[0063]** Nativ: Der Begriff Nativ bezieht sich auf eine natürlicher Weise vorkommende („Wildtyp“) Nukleinsäure oder Polypeptid. Die native Nukleinsäure oder das native Protein kann von einem bestimmten Organismus abgeleitet sein in dem es natürlich vorkommt oder in dem es als ein synthetisch konstruiertes Protein oder eine synthetisch konstruierte Nukleinsäure vorkommt, die zur natürlich vorkommenden Nukleinsäure oder zum natürlich vorkommenden Protein identisch ist.

**[0064]** Isoliert: Eine isolierte Nukleinsäure ist eine Nukleinsäure, die im Wesentlichen von anderen Nukleinsäuresequenzen der Zelle des Organismus, in der die Nukleinsäure natürlicher Weise vorkommt, beispielsweise andere chromosomal und extrachromosomal DNA und RNA, unter Verwendung konventioneller Nukleinsäure-Aufreinigungsmethoden im Wesentlichen getrennt oder weggereinigt wurde. Der Begriff umfasst auch rekombinante Nukleinsäuren und chemisch synthetisierte Nukleinsäuren.

**[0065]** Pflanze: Der Begriff Pflanze umfaßt jede höhere Pflanze und Vorläufer davon, einschließlich Monokotyledone (beispielsweise Mais, Reis, Weizen, Gerste, Raps, Soja, Sonnenblumen, etc.), Dikotyledone (beispielsweise Kartoffel, Tomate, etc.) und schließt Teile von Pflanzen, einschließlich Samen, Früchte, Knollen, etc. ein.

**[0066]** Die Erfindung wird durch Verweis auf die hierin befindlichen Beispiele besser verstanden werden. Der Umfang der Erfindung ist jedoch nicht dadurch beschränkt.

#### Beschreibung und allgemeine Verfahren der Offenbarung

**[0067]** Die vorliegende Erfindung verwendet Standardlaborverfahren für die Klonierung, Manipulation und Sequenzierung von Nukleinsäuren, die Reinigung und Analyse von Proteinen und anderen molekulärbiologischen und biochemischen Verfahren, soweit nicht anderweitig angegeben. Solche Verfahren sind detailliert in Standardlaborbüchern, wie Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989; und Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green and Wiley Interscience, NY, 1987 beschrieben.

**[0068]** Die Erfinder haben eine neuartige Fettsäure  $\Delta^8$ -Desaturase des Protisten Euglena gracilis und eine neue Fettsäure  $\Delta^5$ -Desaturase von Caenorhabditis elegans identifiziert, kloniert und exprimiert, die zusammen zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren verwendet werden können.

**[0069]** Die Erfindung stellt neue gereinigte Proteine bereit ([Fig. 7A](#)). Ebenso stellt die Erfindung Proteine bereit, die vom Protein der [Fig. 7A](#) durch eine oder mehrere konservative Aminosäuresubstitutionen differieren sowie Proteine, die zu dem Protein der [Fig. 7A](#) „im Wesentlichen ähnlich“ sind. Der Begriff „im Wesentlichen ähnlich“ ist im Abschnitt „Definitionen“ definiert. Proteine gemäß der vorliegenden Erfindung schließen Proteine mit ein, die mindestens 50 % Aminosäureidentität mit dem Protein gemäß [Fig. 7A](#) aufweisen. Der Begriff „50 % Aminosäureähnlichkeit“ ist durch die Verwendung der blastp-Sequenzanalyse Software unter Benutzung der voreingestellten Parameter objektiv und konsistent definiert. Die Proteine gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen auch Proteine mit mindestens 60 %, mindestens 70 %, mindestens 80 %, mindestens 90 % und mindestens 95 % Ähnlichkeit (zur Sequenz der [Fig. 7A](#)) unter Verwendung von blastp mit den voreingestellten Parametern.

**[0070]** Die vorliegende Erfindung stellt bereit:  
Isolierte Nukleinsäuren, die für die oben genannten Proteine kodieren, rekombinante Nukleinsäuren, ein-

schließlich derartiger Nukleinsäuren und Zellen, enthaltend derartige rekombinante Nukleinsäuren. Demgemäß umfassen Nukleinsäuren der Erfindung Nukleinsäuren, die kodieren: (1) für Aminosäuresequenzen wie in [Fig. 7A](#) gezeigt; (2) für Aminosäuresequenzen, die sich von der in [Fig. 7A](#) gezeigten Sequenz durch eine oder mehrere konservativer Aminosäuresubstitutionen unterscheiden; und (3) für Aminosäuresequenzen, die gemäß Messung durch blastp mit den voreingestellten Parametern mindestens 60 % Ähnlichkeit mit der Sequenz der [Fig. 7A](#) aufweisen.

**[0071]** Nukleinsäuren der Erfindung schließen auch Nukleinsäuren ein, die mindestens den Begriff „60 % Ähnlichkeit“ mit den Nukleinsäuren gemäß [Fig. 7B](#) zeigen. Der Begriff „60 % Ähnlichkeit“ ist durch die Verwendung der blastn Software mit den voreingestellten Parametern objektiv definiert. Die Nukleinsäuren der Erfindung schließen auch Nukleinsäuren ein, die mindestens 70 %, mindestens 80 %, mindestens 90 % und mindestens 95 % Ähnlichkeit zur Sequenz der [Fig. 7B](#) unter Verwendung von blastn mit den voreingestellten Parametern zeigen.

**[0072]** Die neuen  $\Delta^8$ -Desaturase-Enzyme können entweder einzeln oder zusammen, beispielsweise innerhalb eines metabolischen Reaktionsweges, verwendet werden, um mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie 20:3 und 20:4 Fettsäuren zu produzieren. [Fig. 1B](#) zeigt ein Beispiel für einen derartigen metabolischen Reaktionsweg. Derartige Reaktionswegen können durch Verwendung entsprechender Expressionssysteme in jede Zelle eingeführt werden. Wie unten detaillierter beschrieben werden wird, besteht ein einfacher Weg zur Bereitstellung solcher Elemente in der Verwendung von kommerziell erhältlichen Expressionssystemen.

**[0073]** Der Umfang der vorliegenden Erfindungen umfaßt nicht nur die Nukleinsäuren in ihrer Gesamtheit, die für die neuen  $\Delta^8$ -Desaturase-Enzyme kodieren (und im Wesentlichen ähnliche Derivate solcher Enzyme), sondern umfaßt auch „Abschnitte“ derartiger Nukleinsäuren (wie im Abschnitt „Definitionen“ definiert). Solche beanspruchten Abschnitte werden dadurch identifiziert, daß sie einen bestimmten Grad an Ähnlichkeit mit Abschnitten ähnlicher Größe der Nukleotide gemäß [Fig. 7B](#) aufweisen und können eine Länge von ungefähr 15, 20, 30, 40 oder 50 benachbarten Nukleotiden haben. Die Ähnlichkeit wird mittels einer Sequenzvergleichssoftware wie „blastn“ und „blastp“ Software gemessen, die vom National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) und im Internet unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> erhältlich ist. Die Ähnlichkeit zwischen den beanspruchten Abschnitten von Nukleinsäuren und Abschnitten ähnlicher Größe der Nukleinsequenzen gemäß [Fig. 7B](#) kann mindestens 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % oder sogar 98% betragen. Solche Abschnitte von Nukleinsäuren können beispielsweise als Primer oder Sonden für die Forschung und diagnostische Zwecke verwendet werden. Abschnitte von Nukleinsäuren können aus jedem Bereich der Sequenz wie in [Fig. 7B](#) gezeigt ausgesucht sein, wie beispielsweise der ersten, zweiten, dritten etc. Gruppe von hundert Nukleinsäuren gemäß der Numerierung in den Figuren.

**[0074]** Die oben erwähnten rekombinanten Nukleinsäuren können beispielsweise die gesamte oder einen Abschnitt einer offenbarten Nukleinsäure operativ verbunden mit einem weiterem Nukleinsäureelement enthalten, so wie beispielsweise einem Promotor als Teil eines Klons, der zur Expression eines Proteins entworfen wurde. Klonierungs- und Expressionssysteme für derartige Zwecke sind kommerziell erhältlich.

**[0075]** Verschiedene Hefestämme und von Hefen abgeleitete Vektoren werden gewöhnlicher Weise zur Expression und Reinigung von Proteinen verwendet, so sind beispielsweise Pichia pastoris Expressionssysteme von Invitrogen (Carlsbad, CA) erhältlich. Solche Systeme umfassen geeignete Pichia pastoris Stämme, Vektoren, Reagenzien, Sequenzprimer und Medien. Ebenfalls von Invitrogen erhältlich ist ein ähnliches System zur Expression von Proteinen in Saccharomyces cerevisiae, das Vektoren, Reagenzien und Medien beinhaltet. Eine Nukleotidsequenz (beispielsweise ein Gen, das für die  $\Delta^5$ - oder  $\Delta^8$ -Desaturase-Enzyme der Erfindung kodiert) kann beispielsweise in den Hefeexpressionsvektor pYES2 kloniert werden und unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors, wie dem Galactose-induzierbaren Promotor (GAL 1) exprimiert werden.

**[0076]** Es können auch solche eukaryontischen Vektoren für die Expression der Desaturasen gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden, die nicht für Hefen geeignet sind. Beispiele derartiger Systeme sind das gut bekannte Baculovirus System, das ecdysoninduzierbare Säugetier-Expressionssystem, das regulatorische Elemente aus Drosophila melanogaster zur Kontrolle der Genexpression verwendet und das Sindbis virale Expressionssystem, das Überexpression in einer Vielzahl von Säugetierzelllinien ermöglicht. Diese Expressionssysteme sind ebenfalls von Invitrogen erhältlich.

**[0077]** Es können standardmäßige prokaryontische Klonierungsvektoren verwendet werden, beispielsweise pBR322, pUC18 oder pUC19 wie in Sambook et al., 1989, beschrieben. Die für Desaturasen der vorliegenden Erfindung kodierenden Nukleinsäuren können in derartige Vektoren kloniert werden, die dann in Bakterien, wie

Escherischia coli (E. coli) transformiert werden können und dann so kultiviert werden können, daß sie das interessierende Protein exprimieren. Andere prokaryontische Expressionssysteme beinhalten beispielsweise das Arabinose-induzierte pBAD Expressionssystem, das eine eng kontrollierte Regulation der Expression ermöglicht, das IPTG-induzierte pRSET System, das die schnelle Reinigung von rekombinanten Proteinen ermöglicht und das IPTG-induzierte pSE402 System, das zur optimalen Translation von eukaryontischen Genen konstruiert worden ist. Diese drei Systeme sind von Invitrogen kommerziell erhältlich und ermöglichen eine routinemäßige Expression und Reinigung von Proteinen, sofern sie gemäß den Herstellerangaben verwendet werden.

**[0078]** Alternative und für die vorliegende Erfindung besonders wichtiger Weise kann auch ein Pflanzenexpressionssystem verwendet werden. Pflanzenexpressionssysteme sind kommerziell erhältlich. Das interessierende Gen gemäß der Erfindung kann in einem Vektor kloniert werden und das Konstrukt kann dazu verwendet werden, eine Pflanzenzelle zu transformieren. Jeder gute bekannte Vektor, der zur stabilen Transformation von Pflanzenzellen und/oder zur Herstellung von transgenen Pflanzen geeignet ist, kann hierzu verwendet werden, einschließlich derer, die beispielsweise in Pouwels et al., Cloning Vectors : A Laboratory Manual, 1985, supp. 1987; Weissbach and Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989; und Gelvin et al., Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1990 beschrieben sind. Solche Pflanzenexpressionsvektoren können Expressionskontrollsequenzen enthalten (beispielsweise induzierbare oder konstitutive, von der Umwelt oder Entwicklung regulierte, oder zell- oder gewebespezifische Expressions-Kontrollsequenzen).

**[0079]** Beispiele von konstitutiven Pflanzenpromotoren, die für die Expression von Desaturase-Enzymen in Pflanzen nützlich sind, umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt, den Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) 35S Promoter (siehe beispielsweise Odel et al., Nature 313: 810, 1985; Dekeyser et al., Plant Cell 2: 591, 1990; und Terada and Shimamoto, Mol. Gen. Genet. 220: 389, 1990); den Opaline-Synthase-Promoter (An et al., Plant Physiol. 88: 547, 1988) und den Octopin-Synthase-Promoter (Fromm et al., Plant Cell 1: 977, 1989).

**[0080]** Eine Vielzahl von Pflanzengenpromotoren, die als Antwort auf Umwelt-, Hormon-, chemische und/oder Entwicklungssignale reguliert werden, können auch für die Proteinexpression in Pflanzenzellen verwendet werden, einschließlich der Promotoren, die reguliert werden durch (1) Hitze (Callis et al., Plant Physiol. 88: 965, 1988), (2) Licht, beispielsweise Erbsen rbcS-3A Promoter, Kuhlemeier et al., Plant Cell 1: 471, 1989; Mais rbcS Promoter, Schaffner and Sheen, Plant Cell 3: 997, 1991; oder Chlorophyll a/b-bindendes Protein Promoter, Simpson et al., EMBO J. 4: 2723, 1985), (3) Hormone, wie Abscisinsäure (Marcotte et al., Plant Cell 1: 969, 1989), (4) Verwundung (beispielsweise, wuml, Siebertz et al., Plant Cell 1: 961, 1989); oder (5) Chemikalien wie Methyljasmonat, Salizylsäure oder einen „safener“. Es kann auch vorteilhaft sein (6) Organ-spezifische Promotoren zu verwenden (beispielsweise Roshal et al., EMBO J. 6: 1155, 1987; Schernthaner et al., EMBO J. 7: 1249, 1988; Bustos et al., Plant Cell 1: 839, 1989; Zheng et al., Plant J. 4: 357-366, 1993). Eine gewebespezifische Expression kann durch Verwendung bestimmter Arten von Promotoren ermöglicht werden, zum Beispiel ist der Napin Promotor ein Sameneinlagerungsproteinpromotor von Brassica und spezifisch für sich entwickelnde Samen. Die  $\beta$ -Conglycinin Promotoren steuern die Expression von rekombinanten Nukleinsäuren und erlauben daher die Expression der  $\Delta^5$ - oder  $\Delta^8$ -Proteine gemäß der vorliegenden Erfindung ausschließlich in spezifischen Geweben, zum Beispiel Samengewebe.

**[0081]** Pflanzenexpressionsvektoren können regulatorische Sequenzen aus dem 3'-untranslatierten Bereich von Pflanzengenen enthalten (Thornburg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 744, 1987; An et al., Plant Cell 1: 115, 1989), beispielsweise eine 3'-Terminierungsregion, um die mRNA Stabilität der mRNA zu erhöhen, wie beispielsweise die PI-II Terminatorregion von Kartoffeln oder die Octopin- oder Opylin-Syntase 3'-Terminatorregion.

**[0082]** Die Gruppe der nützlichen dominanten selektierbaren Markergene für die Expression in Pflanzenzellen schließt ein, ist aber nicht daraufbeschränkt: Gene kodierend für Antibiotikaresistenzgene (beispielsweise Resistenz gegenüber Hygromycin, Kanamycin, Bleomycin, G418, Streptomycin, oder Spektinomycin); und Herbizidresistenzgene (beispielsweise Phosphinothricin Acetyltransferase). Geeignete screenbare Marker schließen ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt,  $\beta$ -Glukuronidase und das grün-fluoreszierende Protein.

**[0083]** Die vorliegende Erfindung stellt auch Zellen oder Pflanzen oder Organismen bereit, die mit rekombinanten Nukleinsäurekonstrukten transformiert wurden, die das gesamte oder einen Abschnitt der neu entdeckten Polynukleotide umfassen, die für die neuartigen  $\Delta^8$ -Desaturase-Enzyme kodieren. Ein Beispiel für derartige transformierte Pflanzen oder Organismen wäre eine Kartoffel, Tomate, Rapssamen, Sonnenblume, Soja, Weizen oder Maispflanze. Mulizelluläre Pilze, so wie der eßbare Pilz können auch transformiert werden. Transfor-

mierte Ölsamenpflanzen sind von besonderem Interesse, da 20-Kohlenstoff-mehrfachungesättigte-Fettsäuren sich im Samenöl anreichern würden.

**[0084]** Nukleinsäurekonstrukte, die eine Nukleinsäure gemäß der vorliegenden Erfindung exprimieren, können in eine Vielzahl von Wirtszellen oder Organismen eingeführt werden, um deren Fettsäure-Biosynthese zu verändern. Höhere Pflanzenzell-, eukariontische und prokaryonitische Wirtszellen können alle mit einem geeigneten Expressionssystem wie oben beschrieben transformiert werden.

**[0085]** Nachdem eine cDNA (oder ein Gen) kodierend für eine Desaturase isoliert worden ist, können standardmäßige Techniken verwendet werden, um die cDNA in transgenen Pflanzen zu exprimieren, um die jeweiligen Pflanzeneigenschaften zu modifizieren. Die grundlegende Herangehensweise besteht in der Klonierung der cDNA in einen Transformationsvektor, so daß die cDNA mit einer Kontrollsequenz (beispielsweise einem Promotor) operativ verbunden ist, wodurch die Expression der cDNA in den Pflanzenzellen gesteuert wird. Der Transformationsvektor wird dann durch einen von verschiedenen Techniken, wie beispielsweise durch Agrobakterium vermittelte Transformation von Pflanzen oder Pflanzengeweben oder durch Elektroporation von Protoplasten in Pflanzenzellen eingeführt und Abkömmlingspflanzen enthaltend die eingeführte cDNA werden selektiert. Der gesamte oder Teile des Transformationsvektors werden stabil in das Genom der Pflanzenzelle integriert. Der Teil des Transformationsvektors, der in die Pflanzenzelle integriert und die eingeführte cDNA und assoziierte Sequenzen zur Kontrolle der Expression enthält (das eingeführte „Transgen“) kann als „rekombinante Expressionskassette“ bezeichnet werden.

**[0086]** Die Selektion von Abkömmlingen enthaltend das eingeführte Transgen kann auf der Grundlage der Feststellung eines veränderten Phänotyps erfolgen. Solch ein Phänotyp kann direkt aus der in den Transformationsvektor klonierten cDNA resultieren oder kann sich auch als erhöhte Resistenz gegenüber einem chemischen Agens (beispielsweise einem Antibiotika) als Folge des Einschlusses eines dominanten selektierbaren Markergens, das in den Transformationsvektor eingeführt wurde, manifestieren.

**[0087]** Erfolgreiche Beispiele für die Modifikation von Pflanzeneigenschaften durch Transformation mit klonierten cDNA Sequenzen sind in der technischen und wissenschaftlichen Literatur mannigfaltig. Ausgewählte Beispiele, die das Wissen in diesem Technologiefeld illustrieren sollen, schließen ein:

U.S. Patent Nr. 5,571,706 ("Plant Virus Resistance Gene and Methods")

U.S. Patent Nr. 5,677,175 ("Plant Pathogen Induced Proteins")

U. S. Patent Nr. 5,510,471 ("Chimeric Gene for the Transformation of Plants")

U. S. Patent Nr. 5,750,386 ("Pathogen-Resistant Transgenic Plants")

U.S. Patent Nr. 5,597,945 ("Plants Genetically Enhanced for Disease Resistance")

U.S. Patent Nr. 5,589,615 ("Process for the Production of Transgenic Plants with Increased Nutritional Value Via the Expression of Modified 2S Storage Albumins")

U.S. Patent Nr. 5,750,871 ("Transformation and Foreign Gene Expression in Brassica Species")

U.S. Patent Nr. 5,268,526 ("Overexpression of Phytochrome in Transgenic Plants")

U.S. Patent Nr. 5,262,316 ("Genetically Transformed Pepper Plants and Methods for their Production")

U.S. Patent Nr. 5,569,831 ("Transgenic Tomato Plants with Altered Polygalacturonase Isoforms")

**[0088]** Diese Beispiele schließen die Beschreibung der Auswahl von Transformationsvektoren, von Transformationstechniken und der Konstruktion von Konstrukten zur Überexpression der eingeführten cDNA ein. Im Licht des vorhergesagten und der hiermit erfolgten Bereitstellung der Desaturase-Aminosäuresequenzen und Nukleinsäuresequenzen ist es offensichtlich, daß ein Fachmann auf den vorliegenden Gebiet zur Einführung von cDNAs oder homologen oder abgeleiteten Formen dieser Moleküle in Pflanzen in der Lage ist, um Pflanzen mit erhöhter Desaturase-Aktivität zu erzeugen. Die Expression von einer oder mehreren Desaturasen in Pflanzen könnte weiterhin Pflanzen mit erhöhter Produktion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zur Folge haben.

**[0089]** Die Erfindung betrifft weiterhin Antikörper gegen die Desaturase-Enzyme und deren Fragmente, wobei diese Antikörper zur Reinigung und Detektion der Desaturasen nützlich sein können. Die Bereitstellung der Desaturase-Sequenzen ermöglicht die Produktion von spezifischen Antikörper-basierten Bindungsagenzien für diese Enzyme.

**[0090]** Zu diesen Desaturasen, zu Teilen dieser Desaturasen oder Varianten davon können monoklonale oder polyklonale Antikörper produziert werden. Optimaler Weise werden die gegen Epitope dieses Antigens hergestellten Antikörper das Enzym spezifisch nachweisen. Mit anderen Worten, die Antikörper, die gegen die Desaturasen erzeugt wurden, würden nur diese Desaturasen erkennen und binden und würden nicht in substan-

tieller Weise andere Proteine erkennen und diese binden. Die Feststellung, daß ein Antikörper ein Antigen spezifisch bindet, kann auf der Grundlage eines beliebigen Essays aus einer Reihe von standardisierten Immunoassaymethoden erfolgen; beispielsweise durch „Western blotting“, Sambrook et al. (ed.), Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed. Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

**[0091]** Um zu bestimmen, daß eine gegebene Antikörperpräparation (wie eine in einer Maus gegen die  $\Delta^5$ -Desaturase produzierte Präparation) die Desaturase durch „Western blotting“ spezifisch detektiert, wird das gesamt zelluläre Protein aus Zellen extrahiert und auf einem SDS-Polyakrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Die Proteine werden dann durch „Western blotting“ auf eine Membran (beispielsweise aus Nitrozellulose) transferiert und die Antikörperpräparation wird mit der Membran inkubiert. Nach dem Waschen der Membran, um nicht spezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wird das Vorhandensein von spezifisch gebundenen Antikörpern durch Verwendung eines Antimausantikörpers detektiert, der zu einem Enzym wie beispielsweise alkalische Phosphatase konjugiert ist, detektiert; die Applikation von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat/Nitroblautetrazolium führt zur Produktion einer tiefblau gefärbten Verbindung durch die immunolokalierte alkalische Phosphatase.

**[0092]** Mittels dieser Technik kann gezeigt werden, daß Antikörper, die eine Desaturase spezifisch detektieren im Wesentlichen nur an die Desaturase Bande binden (mit einer Position auf dem Gel, die mittels des Molekulargewichtes der Desaturase bestimmt wird). Eine nicht spezifische Bindung des Antikörpers an andere Proteine kann vorkommen und kann auf dem „Western blot“ als schwächeres Signal detektierbar sein (das mittels automatischer Radiographie quantifizierbar sein kann). Die unspezifische Natur dieser Bindung wird vom Fachmann anhand des schwachen Signals auf dem „Western blot“ relativ zum starken primären Signal der spezifischen Antidesaturasebindung erkannt werden. Antikörper, die Desaturasen spezifisch binden, gehören zu einer Molekülklasse, die im Folgenden als „spezifische Bindungsagenzien“ angesprochen werden. Spezifische Bindungsagenzien, die zur spezifischen Bindung an Desaturasen der vorliegenden Erfindung fähig sind, können polyklonale Antikörper, monoklonale Antikörper und Fragmente von monoklonalen Antikörpern, wie Fab, F(ab')<sub>2</sub> und Fv Fragmente, als auch andere Agenzien, die zur spezifischen Bindung an eines oder mehrerer Epitope des Proteins fähig sind, einschließen.

**[0093]** Im Wesentlichen reine Desaturasen, die zur Verwendung als Immunogenen verwendbar sind, können aus transfizierten Zellen, transformierten Zellen oder Wildtyp Zellen isoliert werden. Die Protein Konzentration in der Endpräparation wird beispielsweise durch Konzentration an einem Amicon Filter eingestellt, so daß die Konzentration einige mg/ml beträgt. Alternativ dazu können Peptidfragmente einer Desaturase als Immunogenen verwendet werden. Solche Fragmente können unter Verwendung von Standardmethoden chemisch synthetisiert werden oder durch Verdau des gesamten Desaturase-Enzyms gefolgt von der Reinigung der gewünschten Peptidfragmente erhalten werden. Selbst Peptide mit einer Länge von 3 oder 4 Aminosäuren sind immunogen, wenn sie dem Immunsystem im Kontext eines Major Histocompatibility Complex (MHC) Moleküls, wie MHC Klasse I oder MHC Klasse II präsentiert werden. Demgemäß können Peptide umfassend mindestens drei und bevorzugt mindestens 4, 5, 6 oder mehr aufeinanderfolgende Aminosäuren der offenbarten Desaturase Aminosäuresequenz als Immunogene für die Produktion von Antikörpern verwendet werden.

**[0094]** Monoklonale Antikörper zu jeder von diversen Epitopen der Desaturase-Enzyme, die gemäß dieser Beschreibung identifiziert und isoliert werden, können von Mäusehybridomen gemäß der klassischen Methode von Köhler & Milstein, Nature 256: 495, 1975 oder einer davon abgeleiteten Methode produziert werden. Kurzgefaßt wird eine Maus wiederholt mit einigen Mikrogramm des gewählten Proteins über einen Zeitraum von einigen Wochen inkuliert. Die Maus wird dann geopfert und die Antikörper-produzierenden Zellen der Milz isoliert. Die Milzzellen werden mittels Polyethylenglykol mit Mausmyelomzellen fusioniert und die überzähligen unfusionierten Zellen werden durch Züchtung des Systems auf selektiven Medium enthaltend Aminopterin (HAT Medium) zerstört. Die erfolgreich fusionierten Zellen werden verdünnt und Aliquots der Verdünnung werden in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte plaziert, in den die Züchtung der Kultur fortgeführt wird. Antikörperproduzierende Klone werden durch Nachweis von Antikörpern in der überstehenden Flüssigkeit der Vertiefungen durch Immunoassayverfahren wie dem ELISA identifiziert, wie ursprünglich beschrieben von Engvall, Enzymol. 70: 419, 1980 oder einer davon abgeleiteten Methode. Selektierte positive Klone können expandiert werden und ihr monoklonales Antikörperprodukt kann zur Verwendung geerntet werden. Detaillierte Anweisungen zur Produktion von monoklonalen Antikörpern sind in Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988 beschrieben.

**[0095]** Polyklonales Antiserum enthaltend Antikörper gegen heterogene Epitope eines einzelnen Proteins können durch Immunisierung geeigneter Tiere mit dem exprimierten Protein hergestellt werden, wobei das Protein unmodifiziert oder modifiziert sein kann um die Immunogenität zu erhöhen. Die effektive polyklonale

Antikörperproduktion wird von vielen Faktoren beeinflußt, die sowohl das Antigen als auch die Wirtsart betreffen. Beispielsweise tendieren kleine Moleküle dazu, weniger immunogen zu sein als andere Moleküle und dies kann die Verwendung von Trägern und einem Adjuvants nötig machen. Auch variieren Wirtstiere bezüglich ihrer Immunantwort zu dem Inokulationsort und der Dosis, wobei sowohl inadäquate als auch übermäßige Antigendosen Seren mit kleinen Titern hervorrufen. Kleine Antigendosen (ng-Bereich), die an verschiedenen intradermalen Orten appliziert werden, erscheinen am zuverlässigsten. Ein effektives Immunisationsprotokoll für Hasen kann in Vaitukaitis et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 33: 988-991, 1971 gefunden werden.

**[0096]** Boosterinjektionen können in regelmäßigen Intervallen gegeben werden und das Antiserum wird geerntet, wenn dessen Antikörpertiter zu fallen beginnt, bestimmt durch semiquantitative Methoden, beispielsweise durch Doppelimmunodiffusion in Agar gegen bekannte Antigenkonzentrationen. Vergleiche beispielsweise Ouchterlony et al., Handbook of Experimental Immunology, Wier, D. (ed.), Chapter 19, Blackwell, 1973. Eine Plateau-Antikörperkonzentration liegt gewöhnlicher Weise im Bereich von 0,1 bis 0,2 mg/ml Serum (ungefähr 12 µmol/l). Die Affinität der Antiseren für das Antigen wird durch Aufnahme kompetitiver Bindungskurven unter Verwendung konventioneller Methoden bestimmt.

**[0097]** Antikörper können gegen die Desaturasen der vorliegenden Erfindung durch subkutane Injektion eines die Enzyme exprimierenden DNA-Vektors in Labortiere wie Mäuse produziert werden. Die Einführung des rekombinanten Vektors in die Tiere kann mittels einer tragbaren Form des Biolistic-Systems (Sanford et al., Particulate Sci. Technol. 5: 27-37, 1987, gemäß der Beschreibung von Tang et al., Nature (London) 356: 153-154, 1992) erfolgen. Die für diesen Zweck geeigneten Expressionsvektoren schließen die Vektoren ein, die die cDNA des Enzyms unter der transkriptionellen Kontrolle entweder des menschlichen β-Aktinpromotors oder des Zytomegalovirus (CMV) Promotors exprimieren. Verfahren zur Gabe nackter DNA an Tiere in einer Weise, die in der Expression der DNA im Körper des Tieres resultiert, sind bekannt und beschrieben worden, beispielsweise in den US-Patenten Nr. 5,620,896 ("DNA Vaccines Against Rotavirus Infections"); 5,643,578 ("Immunoization by Inoculation of DNA Transcription Unit"); und 5,593,972 ("Genetic Immunization") und den darin aufgeführten Literaturangaben.

**[0098]** Anstelle von ganzen Antikörpern können auch Antikörperfragment verwendet werden, wobei diese in prokaryontischen Wirtszellen exprimiert werden können. Verfahren zur Herstellung und Verwendung immuno- logisch effektiver Teile von monoklonalen Antikörpern, die auch als „Antikörperfragmente“ bezeichnet werden, sind bekannt, einschließlich der in Better & Horowitz, Methods Enzymol. 178: 476-496, 1989; Glockshuber et al. Biochemistry 29: 1362-1367, 1990; und U. S. Patent Nos. 5,648,237 ("Expression of Functional Antibody Fragments"); No. 4,946,778 ("Single Polypeptide Chain Binding Molecules"); und No. 5,455,030 ("Immuno- therapy Using Single Chain Polypeptide Binding Molecules"), und darin genannten Literaturstellen beschrieben.

#### Experimentelle Beispiele

##### Beispiel 1: Organismenstämme und Kulturen

**[0099]** Der Stamm Euglena gracilis C wurde von Columbia Scientific erhalten. Der Organismus wurde auf Cramer and Meyers Medium (Cramer, and Meyers, Archiv für Mikrobiologie 17: 384-402, 1952) unter Hinzufü- gung von Saccharose als Kohlenstoffquelle kultiviert. Die Kulturen wurden bei 25°C in absoluter Dunkelheit gehalten.

**[0100]** *C. elegans* wurde vom Caenorhabditis Genetics Center, St. Paul, Minnesota erhalten und unter Standardbedingungen (Sulston et al., The Nematode *Caenorhabditis elegans* (Wood, W. B., Eds.), S. 587-606, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988) kultiviert.

##### Beispiel 2: Durchsuchen von Datenbanken für *C. elegans* Gen Homologe

**[0101]** Die *C. elegans* genomische Datenbank des Sanger Centers ([http://www.sanger.ac.uk/projects/c\\_elegans/blast\\_server.shtml](http://www.sanger.ac.uk/projects/c_elegans/blast_server.shtml)) wurde mittels BLAST™ mit Sequenzen von Pflanzen Desaturase-Enzymen, einschließlich der *B. officinalis* Δ<sup>6</sup>-Desaturase (GenBank accession number U7901 0) durchsucht. Die zwei *C. elegans* Polypeptide mit den höchsten Werten (Scores) waren ein Peptid auf dem Cosmid W08D2 (Wert 163) und eines auf T13F2 (Wert 121).

Beispiel 3: RNA Isolation, Reverse Transkription-PCR und RACE (Schnelle Amplification von cDNA Enden)

**[0102]** Für das *E. gracilis*  $\Delta^8$ -Gen wurde Gesamt-RNA aus heterotrophen Kultutren von *E. gracilis* mittels eines Phenol-SDS-Protokolls (Ausubel, Current Protocols In Molecular Biology, 1988) isoliert. Aus der Gesamt-RNA wurde Boten-RNA (mRNA) mittels des PolyA-tract Systems (Promega Scientific, Madison, Wisconsin) gereinigt. Diverse Transkriptionsreaktionen wurden unter Verwendung von Superscript II™ (Life Technologies, Rockville, Maryland) durchgeführt. Die Synthese des ersten Stranges wurde in den initialen Reaktionen mittels eines verankerten PolyT Primers (Clontech, Palo Alto, California) initiiert. Die Synthese des zweiten Stranges wurde wie beschrieben durchgeführt (Life Technologies) und eine Polymerasekettenreaktionamplifikation der Kernregion des Gens wurde unter Verwendung der Primer (GGCTGGCTGACNCAYGARTTYTGY-CAY; SEQ. ID NO. 5) und (CATCGTTGGAAANARRTGRTGYTCATYTG; SEQ. ID NO. 6) erreicht, wobei die Primer so konstruiert wurden, daß sie zu Sequenzen, die mit dem ersten und dritten His-Box Regionen des  $\Delta^6$ -Desaturase *C. elegans* Gens überlappen, vollständig degeneriert sind.

**[0103]** Das Amplifikationsprotokoll wurde unter Hinzuziehung veröffentlichter Leitfaden für die Verwendung von degenerierten Primern (Compton, PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications, 1990) entwickelt. Die Amplifikation bestand aus fünf vorläufigen Zyklen bei sehr geringer Anlagerungs-(annealing)Temperatur (30 Sekunden bei 94°C, 1 Minute Rampe auf 37°C, 34 Sekunden bei 37°C, 3 Minuten Rampe auf 72°C, gefolgt von 30 Zyklen mit hoher Temperatur (30 Sekunden bei 94°C, 1 Minute Rampe auf 50°C, 45 Sekunden bei 50°C, 3 Minuten Rampe auf 72°C). Die vorläufigen Amplifikationen zur Optimierung der thermischen Zyklieungsparameter wurden unter Verwendung von Pfu-DNA Polymerase (Stratagene, La Jolla, California) durchgeführt. Die Amplifikation konnte bei 3 mmol/l Magnesium und einer Konzentration jedes Primers von 4  $\mu$ mol/l erfolgreich durchgeführt werden. Nachfolgend wurde Taq Polymerase zur Amplifikation unter identischen Bedingungen verwendet.

**[0104]** Die Produkte der Polymerasekettenreaktion mit 350 bis 750 Basenpaaren wurden mit kommerziellen Reagenzien (Qiagen, Valencia, California) aus Agarose Gelen isoliert und nachfolgend unter Verwendung der degenerierten Primer und der „dye-termination“ Sequenztechnologie (Applied Biosystems, Foster City, California) sequenziert. Eine Gruppe von identischen Amplifikationsprodukten enthielt einen offenen Leserahmen, der, wenn mittels einer BLAST™-Suche analysiert (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997), zu bekannten Desaturasen homolog war. Die 5'- und 3'-Sequenzen der kompletten mRNA wurden mittels des Marathon RACE Systems (Clontech) erhalten, und zwar unter Verwendung von Paaren von „genesteten“ Primern, die zur Amplifizierung von innerhalb der Kernsequenz konstruiert waren. Zur Klonierung des kompletten 5'-Endes des Gens war es notwendig, die Reverse Transkription mit einem zur Sequenz des offenen Leserahmens spezifischen Primer zu wiederholen und die 5'-RACE Amplifikation zu wiederholen.

**[0105]** Für das *C. elegans*  $\Delta^5$ -Gen wurde die RNA Isolation und die Reverse Transkriptions-PCR wie folgt durchgeführt. Eine RT PCR wurde zur Amplifizierung der kodierenden Sequenzen der zwei mutmaßlichen Desaturase Gene durchgeführt. Gesamt-RNA aus verschiedenen Stadien von *C. elegans* wurde als RT PCR Templat eingesetzt. Die Nematoden wurden auf Agarplatten wie beschrieben gezüchtet und RNA wurde unter Verwendung der Phenol/SDS Methode isoliert (Sluder et al., Dev. Biol. 184: 303-319, 1997). Die RT PCR wurde unter Verwendung des Superscript One-Step RT PCR Systems (Gibco-BRL/Life Technologies) durchgeführt. Ungefähr 1  $\mu$ g Gesamt-RNA wurde zu einem Reaktionsansatz zugegeben, wobei der Reaktionsansatz aus 0,2 mmol/l jedes dNTPs, 1,2 mmol/l MgSO<sub>4</sub>, Superscript II™ RT/Taq Polymerasemix und 200  $\mu$ mol/l geeigneter stromabwärts („downstream“) und stromaupwärts („upstream“) Primern bestand. Die Reaktionen wurden bei 50°C für 30 Minuten inkubiert und dann 35 Zyklen einer PCR Amplifikation unterzogen. Für das T13F2.1 Gen (fat4) wurde ein 5'-Primer verwendet, der zu den Basen 34339-34361 des Cosmids T13F2 korrespondierte. Smal, HindIII, und Xhol Restriktionsstellen wurden diesen Sequenzen hinzugefügt um die Klonierung zu vereinfachen. Die resultierenden Primer

[CCCGGGAGCTTCTCGAGGAATTTCATCCTCCTGGGTC; SEQ. ID NO: 7] binden an den Cosmid T13F2 19 bis 42 Basenpaare oberhalb des mutmaßlichen Start Codon ATG des fat4 Gens. Zur Amplifizierung des 3'-Endes des fat4 Gens wurde ein Primer verwendet, der zum invers komplementären der Basen 37075-37095 des Cosmids T13F2 korrespondiert, unter Hinzufügung von Smal and BamHI Schnittstellen zur Vereinfachung der Klonierung des interessierenden Polynukleotids:

[CCCGGGTGGATCCGGAACATATCACACGAAACAG; SEQ. ID NO. 8]. Dieser Primer beginnt 93 Basenpaare nach dem mutmaßlichem Stopkodon TAG und endet 20 Basenpaare oberhalb des vorhergesagten Polyadenylierungssignals (AAUAAA; SEQ ID NO: 9) des fat4 Gens.

**[0106]** Zur Bestimmung des Transspleißens von spezifischen Führungssequenzen wurden „downstream“ Primer, die mit dem Komplementär der Basen 35009-35028 des T13F2 korrespondieren (TCTGG-

GATCTCTGGTTCTTG; SEQ. ID NO: 10) für das T13F2.1 Gen verwendet. Die „upstream“ PCR Primer waren entweder SLI-20 oder SL2-20 (Spieth et al., Cell 73:521-532, 1993). Das *C. elegans* Homologe des ribosomalen Proteins L37 wurde als SL2-spezifische Kontrolle verwendet und K06H7.3 wurde als SL2-spezifische Kontrolle verwendet (Zorio et al., Nature 372:270-272, 1994). SL1-20, SL2-20 und Kontrollprimer wurden freundlicherweise von Diego A. R. Zorio zur Verfügung gestellt. Die durch Gelelektrophorese visualisierten RT-PCR Produkte wurden mittels „blotting“ des Gels und Detektion mit einer Sonde mit genspezifischen Oligonukleotiden, die mit dem dazugehörigen Gen wie vorher beschrieben korrespondieren (Spieth et al., Cell 73:21-532, 1993), bestätigt.

#### Beispiel 4: PCR Amplifikation der Gene kodierend für $\Delta^5$ - und $\Delta^8$ -Desaturasen

**[0107]** DNA und Proteinsequenzen wurden unter Verwendung des Wisconsin-GCG Programm Paketes analysiert (Devereux et al., Nucleic Acids Res. 12:387-95, 1984).

**[0108]** Zur Klonierung des *E. gracilis* ( $\Delta^8$ ) offenen Leserahmens als einzelnes DNA Fragment wurde eine Reihe von Primer zur Initiierung einer für den offenen Leserahmen spezifischen Reversen Transkription verwendet. Der Primer für das 5'-Ende des Gens begann 3 Nukleotide vor dem Startkodon und schloß die ersten 26 Nukleotide des offenen Leserahmens mit ein. Der 3'-Primer war zur Sequenz zwischen 22 und 52 Nukleotiden stromabwärts vom vorhergesagten Terminationskodon komplementär. Diese PCR Amplifikation wurde mit Pfu Polymerase durchgeführt, um das Risiko von Amplifikationsfehlern zu minimieren. Die PCR Produkte zeigten bei der Analyse durch Agarose Gelelektrophorese eine einzige Bande der vorhergesagten Größe. Diese Bande wurde in den Vektor pCR-Script CamTM (Stratagene) kloniert und es wurde ein einzelner Klon namens pJW541 für die Analyse ausgewählt.

**[0109]** Zur Expression der *C. elegans*  $\Delta^5$ -Desaturase wurde das fat-4 cDNA Amplifikationsprodukt (siehe Beispiel 3) mit HindIII und BamHI verdaut und in den mit HindIII und BamHI geschnittenen Hefexpressionsvektor pYES2 (Invitrogen) ligiert. Das resultierende Plasmid wurde als pYFAT4 bezeichnet.

#### Beispiel 5: Expression der $\Delta^5$ - und $\Delta^8$ -Desaturasen

**[0110]** Für *E. gracilis* wurde das klonierte  $\Delta^8$ -Gen mittels standardisierter Klonierungstechniken (Ausubel, Current Protocols In Molecular Biology, 1988) unter Verwendung von Enzymen, die von New England Biolabs, Beverly, Massachusetts bezogen wurden, in den Hefexpressionsvektor pYES2 (Invitrogen, Carlsbad, California) transferiert. Das resultierende Hefexpressionskonstrukt enthält den offenen Leserahmen unter der Kontrolle eines Galactose-induzierbaren Promotors wurde als pYES2-541 bezeichnet.

**[0111]** Der *Saccharomyces cerevisiae* Stamm INVSc1 (Invitrogen) wurde mittels Standardmethoden (Ausubel, Current Protocols In Molecular Biology, 1988) mit pYES2-541 transformiert und kultiviert. Flüssigmedium enthaltend 2 % Galactose wurde mit Fettsäureseifen (NuCheck Prep, Elysian MN) zu einer Endkonzentration von 0,2 mmol/l ergänzt. Den Hefekulturen wurde Tergitol (1 %, NP40) zugegeben, um die Fettsäureaufnahme zu erhöhen (Stukey et al., J. Biol. Chem. 264:16537-16544, 1989), außer bei Kulturen enthaltend 20:1, in denen mit 5 % DMSO substituiert wurde. Hefen wurden über Nacht bei 28°C inkubiert, durch Zentrifugation gereinigt, einmal mit 1 % Tergitol gewaschen, einmal mit 0,5 % Tergitol und letztlich einmal mit destilliertem Wasser.

**[0112]** Für das *C. elegans*  $\Delta^5$ -Gen wurden die Konstrukte in den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm INVSc1 transformiert unter Verwendung des S.c. EasyComp Transformationskits (Invitrogen). Für Experimente mit dem FAT4 Peptid wurden transformierte Hefen über Nacht in uracil-defizientem Medium enthaltend 2 % Galactose, 0,2 mmol/l Fettsäuren und 1 % NP-40 kultiviert. Unter diesen Bedingungen bewegte sich der Anteil dieser zugegebenen Fettsäuren, die in die Hefelipide aufgenommen wurden, zwischen 14 bis 28 % der gesamten Hefefettsäuren. Im Experimenten, in den 20:1  $\Delta^1$  als Substrat verwendet wurde, wurde das 1 % NP-40 durch 5 % DMSO ersetzt, um eine bessere Aufnahme dieser Fettsäuren zu erreichen.

#### Beispiel 6: Analyse von Fettsäuren mittels Gaschromatographie und GC-Massenspektroskopie

**[0113]** Die Extraktion von Lipiden und die Präparation von Fettsäuremethylestern wurde unter Benutzung von Standardmethoden durchgeführt (Miquel und Browne, J. Biol. Chem. 267:1502-1509, 1992). Gaschromatographie der Methylester wurde mittels etablierter Methoden durchgeführt (Spychalla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1142-1147, 1997). Fettsäure 4,4-Dimethyloxazolin (DMOX) Derivate von Lipidextrakten aus Hefen wurden mittels Standardmethoden hergestellt (Fay and Richli, J. Chromatogr. 541: 89-98, 1991). GC-Massen-

spektroskopie wurde auf einen Hewlett-Packard 6890 Serie GC-MS ausgestattet mit einer  $30 \times 0,25 \mu\text{m}$  HPSMS Säule durchgeführt, und zwar bei einer Ionisationsspannung von 70 eV mit einem Meßbereich von 50 bis 550 Da. Sofern möglich, wurden Fettsäuren und ihre Derivate durch Vergleich mit einem authentischen Standard identifiziert (NuCheck Prep).

#### Beispiel 7: Identifikation und Amplifikation des Euglena $\Delta^8$ -Desaturase-Gens

**[0114]** Aus heterotrophen Kulturen isolierte Boten RNA wurde als Templat für eine reverse Transkription benutzt, gefolgt von einer PCR Amplifikation unter Verwendung degenerierter Primer, die die erste und dritte konservierte histidinreiche Region von mikrosomalen Desaturase-Proteinen umfassen. Das *C. elegans*  $\Delta^6$ -Desaturase-Gen FAT3 wurde als Basis für das Primer Design verwendet. Um für die nötige hohe Degeneration im Primerpaar zu kompensieren, begannen die Amplifikationsreaktionen mit fünf Zyklen mit einer Anlagerung bei geringer Temperatur und einer langen Temperaturrampe zwischen der Anlagerung und den Polymerisierungsschritten. Vorläufige Amplifikationen zur Optimierung der thermischen Zyklisierungsparameter wurden unter Verwendung der korrekturlesenden Pfu-DNA-Polymerase durchgeführt. Nach erfolgreicher Durchführung der Pfu Amplifikationsreaktionen unter Verwendung hoher Primer und Magnesiumkonzentrationen wurde Taq-Polymerase zur Generierung einer Anzahl von in Agarosegelen detektierbaren Banden verwendet.

**[0115]** Viele dieser Basen von 650 Basenpaaren hatten eine identische Sequenz. Diese DNA Sequenz enthielt einen offenen Leserahmen, in dem die vorher gesagte Aminosäuresequenz homolog zu anderen Membran-Desaturasen war und eine charakteristische zentrale His-Box enthielt. Primer, die so konstruiert wurden, daß sie für die spezifische Sequenz spezifisch sind, wurden zur Amplifizierung der Termini der cDNA mittels der 3'- und 5'-RACE Technik verwendet. Die vollständige cDNA für dieses Gen war 1745 Basenpaare lang. Sie schloß einen offenen Leserahmen von 1272 Basenpaaren und einen 472 Basenpaare langen 3' untranslatierten Bereich ein. Die meisten Euglena Boten-RNAs werden durch Anfügen einer kurzen 5' RNA Führungssequenz, der trans-gepleißten Führungssequenz prozessiert (Tessier et al., *Embo. J.* 10: 2621-2625, 1991). Dieser RNA Prozessierungsschritt hinterließ eine konservierte Sequenz (TTTTTTTCG; SEQ. ID NO. 11) am beginn jeden Botenmoleküls (Cui et al., *J. Biochem. (Tokyo)* 115:98-107, 1994). Das Vorhandensein dieser Führungssequenz innerhalb der cDNA Sequenz bestätigt, daß das Botenmolekül am 5' Ende die volle Länge aufwies. Eine RT PCT, die mit den offenen Leserahmen am 5' und 3' Ende flankierenden Primern durchgeführt wurde, führte zu einer einzelnen Bande, die in den Vektor pCR-Script CamTM (Stratagene) kloniert wurde und als pJW541 bezeichnet wurde. Das Gen, das zu diesem ORF korrespondiert, wurde als EFD1 bezeichnet (Euglena Fettsäure Desaturase 1).

#### Beispiel 8: Ähnlichkeit zwischen Euglena $\Delta^8$ -Desaturase und anderen Proteinen

**[0116]** Der translatierte offene Leserahmen zeigt ein Protein von 422 Aminosäuren mit einer vorhergesagten molekularen Masse von 48,8 kDa ([Fig. 3](#)). Eine BLAST™ Suche in Sequenzdatenbanken zeigte, daß die vorhergesagte Proteinsequenz Homologieregionen mit der bekannten Gruppe von membranständigen Fettsäure-Desaturasen, insbesondere in der hochkonservierten histidinreichen Region (Shanklin et al., *Biochemistry* 33:12787-12794, 1994) aufweist.

**[0117]** Jedes der His-Box Motive ist im EFD1 Protein vorhanden. Das erste Motiv (HXXXH) beginnt bei Aminosäure 146 und das zweite (HXXHH; SEQ ID NO: 12) bei Aminosäure 183 ([Fig. 3](#)). EFD1 enthält eine variierende dritte His-Box, QXXHH (SEQ ID NO: 13), beginnend bei Aminosäure 361, die ähnlich zu der klonierten  $\Delta^5$ - und  $\Delta^6$ -Desaturase ist. EFD1 zeigt eine Konservierung der Proteinsequenz in den Regionen, die die hochkonservierte Region umgeben, insbesondere bei FAT-3 und FAT-4, den  $\Delta^5$ - und  $\Delta^6$ -Desaturasen von *C. elegans* ([Fig. 3](#)). Außerhalb der hochkonservierten Regionen zeigt die Aminosäuresequenz eine deutlich geringere Ähnlichkeit zu anderen Desaturasen. Insgesamt beträgt die Aminosäureidentität mit FAT-3 und FAT-4 33 % verglichen mit 28 %iger Identität mit der Borretsch- $\Delta^6$ -Desaturase.

**[0118]** EFD1 enthält auch ein Zytochrom b5-ähnliches Motiv an seinem N-Terminus. Das Protein kodiert sieben der acht am meisten konservierten Aminosäuren, die für Zytochrom b5 charakteristisch sind ([Fig. 3](#)) und die für Häm-Bindung verantwortlich sind. Ähnliche Motive werden in den N-terminal Regionen von FAT3 und FAT4 ([Fig. 3](#)) und den Borretsch- $\Delta^6$ -Protein wie auch dem Carboxyl-Terminus des Hefe- $\Delta^9$ -Proteins gefunden.

**[0119]** Die Struktur des Euglena-Proteins zeigt auch Ähnlichkeiten mit bekannten Desaturasen. Membranständige Desaturasen sind Typ II mehrfach die Membran-durchspannende Proteine und eine Hydropathieanalyse des klonierten Euglena-Gens indiziert, daß das vorhergesagte Protein mindestens drei signifikant hydrophobe Regionen ausweist, die lang genug sind, um die Membran-Doppelschicht zweimal zu durchqueren. Wie

es bei den meisten Desaturase-Enzymen der Fall ist, sind hier 31 Aminosäurereste zwischen den ersten beiden His-Boxen. Der Abstand zwischen der zweiten und dritten His-Box beträgt 173 Reste, was sich in dem bisher beobachteten Bereich bewegt (Shanklin and Cahoon, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:611-641, 1998).

#### Beispiel 9: Aktivität des Euglena $\Delta^8$ -Desaturase Proteins

**[0120]** Um die Aktivität des Enzyms zu bestätigen, wurde die EFD1 cDNA von pJW541 in den Hefe-Expressionsvektor pYES2 unter die Kontrolle eines Galactose induzierbaren Promotors transferiert. Das resultierende Konstrukt pYES2-541 wurde in *S. cerevisiae* eingebracht. Hefemembranen enthalten keine 20-Kohlenstofffettsäuren, sondern inkorporieren diese aus dem Kulturmedium. Dementsprechend wurden zu den Hefekulturen verschiedene Fettsäureseifen hinzugegeben, wobei ein Hefestamm enthaltend den leeren Vektor als Kontrolle verwendet wurde. Die Fettsäuren der Kulturen wurden mittels Methylester-Derivatisierung und Gaschromatographie analysiert.

**[0121]** Die Muster der Desaturase-Aktivität in diesen Experimenten zeigte, daß pYES2-541 ein  $\Delta^8$ -Desaturase-Enzym exprimiert, daß keine  $\Delta^5$ - oder  $\Delta^6$ -Aktivität besitzt. Die Fähigkeit des experimentellen Hefestamms  $\Delta^8$ -Desaturierung zu produzieren konnte durch Zugabe von 20:2 zum Kulturmedium gezeigt werden ([Fig. 4](#)). Es wurde ein Desaturierungs-Scheitelpunkt (Peak) produziert, dessen Retentionszeit identisch zum authentischen 20:3 ist. Die nur-Vektor Kontrollkultur desaturierte 20:2 nicht ([Fig. 4](#)). Der Hefestamm, der das Euglena-Gen exprimiert, desaturiert ebenfalls 20:3 und 20:1 ([Fig. 4](#)), ebenfall ohne Desaturierungsaktivität in den Kontrollkulturen. Das klonierte Euglena-Protein war mit 20:3 und 20:2 als Substraten am stärksten aktiv und desaturierte 70% und 73% der insgesamt inkorporierten 20-Kohlenstofffettsäure. EFD1 war mit 20:1 am wenigsten aktiv, wobei 32% des Substrates in ein Desaturierungsprodukt umgesetzt wurden ([Fig. 4](#)).

**[0122]** Wenn das Kulturmedium mit einem Substrat für die  $\Delta^5$ -Desaturierung, 20:4 ergänzt wurde, wurde die Fettsäure in die Hefe aufgenommen, aber es wurde kein 20:5 Desaturierungsprodukt produziert. In ähnlicher Weise wurde das Medium mit 18:2 und 18:3 ergänzt, wobei keine Desaturierung erfolgt, was zeigt, daß das klonierte Gen keine  $\Delta^6$ -Desaturase-Aktivität hatte.

**[0123]** Um zu bestätigen, daß die Desaturierung an der  $\Delta^8$ -Position stattgefunden hat, wurden 4,4-Dimethyloxazolin (DMOX) Derivate von Hefefettsäuren mittels GC-MS analysiert. DMOX Derivate zeigen Massenspektren, die einfacher interpretiert werden können als Spektren von Methylestern und eine unzweifelhafte Bestimmung der Position von Doppelbindungen in mehrfachungesättigten Fettsäuren erlauben (Christie, Lipids 33:343-353, 1998). Für das Experiment, bei dem die Fettsäure 20:2 desaturiert wurde, betrug die Retentionszeit des Produktes auf dem GC-MS-Instrument 16,8 Minuten, was identisch ist mit der Retentionszeit von DMOX-derivatisiertem authentischen 20:3. Das Massenspektrum dieses Desaturierungsproduktes und sein molekulares Ion (*m/z* 359) zeigen, daß es sich um eine 20:3 Verbindung handelt hat. Zwei spektrale Frequenzscheitelpunkte bei *m/z* 182 und 194, die nur durch 12 a.m.u. getrennt sind, zeigten, daß die eingeführte Doppelbindung sich in der  $\Delta^8$ -Position befand ([Fig. 5](#)). (Das Substrat 20:2, das an der 8-Position saturiert ist, zeigt Scheitelpunkte bei 182 und 196, getrennt von 14 a.m.u.). Das Spektrum des Produkts mit seinen Desaturierungs-Scheitelpunkten konnte als das von authentischen 20:3 identifiziert werden (Luthria and Sprecher, Lipids 28:561-564, 1993). Die anderen Substrate 20:1 und 20:3 wurden ebenfalls an der  $\Delta^8$ -Position durch EFD1 desaturiert. Die Scheitelpunkte bei *m/z* 182 und *m/z* 194 erschienen in beiden Spektren und das molekulare Ion wurde von dem des Substrates jeweils um zwei reduziert ([Fig. 5](#)).

#### Beispiel 10: Identifikation und Klonierung von zwei Fettsäure *C. elegans* Desaturase-Genen

**[0124]** Zwei offene Leserahmen mit hoher Bewertung wurden während einer Suche in der *C. elegans* genomischen DNA Datenbank mit der Borretsch  $\Delta^6$ -Desaturase-Proteinsequenz gefunden. Beide auf der Grundlage dieser offenen Leserahmen vorhergesagten Proteine, W08D2.4 und T13F2.1 enthielten eine N-terminale Sequenz, die Cytochrom b5 ähnelte, einschließlich der charakteristischen (HPGG) Häm-bindenden Domäne und einer H -> Q Substitution in der dritten Histidin-Box. Das W08D2.4 Gen wurde als fat-3 bezeichnet und das T13F2.1 wurde als FAT4 bezeichnet, da beide Gene für Fettsäure-Desaturasen kodieren: Interessanter Weise sind die fat-3 und fat-4 Gene benachbart auf sich überlappenden Kosmiden in der gleichen 5' nach 3' Orientierung angeordnet, wobei nur 858 Nukleotide das vorhergesagte Polyadenylierungssignal des fat-4 Gens vom ATG Startkodon des fat-3 Gens trennen ([Fig. 8](#)). Diese Anordnung der Gene erinnert an die von Operons, bei denen zwei oder mehrere Gene unter der Kontrolle eines einzelnen Promoters und einer regulatorischen Region transkribiert werden.

**[0125]** In *C. elegans* wird die polycistronische pre-mRNA durch Spaltung und Polyadenylierung am 3' Ende des stromaufwärts gelegenen Genes und trans-spleißen an die SL2 Sequenz am 5' Ende des stromabwärts gelegenen Genes in monozystrische mRNA konvertiert, wobei die beiden mRNAs nachfolgend unabhängig voneinander translatiert werden. Von den mehr als 30 derartiger Operons die analysiert wurden, beträgt der Abstand zwischen dem 3' Ende des stromaufwärts gelegenen Genes und dem 5' Ende des stromabwärts gelegenen Genes normaler Weise 100 Basenpaare, wobei einige durch 300 bis 400 Basenpaare voneinander getrennt sind (Blumenthal et al, *C. elegans* 11, S. 117-145, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, NY, 1997).

**[0126]** Die *C. elegans* fat-3 und fat-4 Gene wurden dahingehend getestet, ob sie entweder an SL1 oder SL2 trans-gespleißt werden, um zu untersuchen, ob sie möglicher Weise in einem einzigen Operon co-transkribiert werden könnten. Es hat sich gezeigt, daß das fat-4 Gen an SL1 trans-gespleißt wurde und daß das fat-3 Gen zu keiner der gespleißten Führungssequenzen trans-gespleißt wurde. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde gefolgert, daß jedes der beiden Gene seinen eigenen 5' Promotor und regulatorische Region aufweist.

**[0127]** Beide Gene wurden mittels RT-PCR kloniert. Die fat-4 Gensequenz war mit der T13F2 genomischen Sequenz identisch. Trotzdem war das Genprodukt, das von der cDNA kodiert wird sieben Aminosäuren kürzer als das von Genefinder für T13F2.1 (GenBank Zugangsnummer Z81122) vorhergesagt worden war, weil die DNA Sequenz, die für die Aminosäuren 198 bis 204 kodiert nicht in der fat-4 cDNA vorhanden war. Das resultierende Peptid hat eine Länge von 447 Aminosäuren anstelle der vorhergesagten 454 Aminosäuren. Das von der fat-3 cDNA Genprodukt war ebenfalls mit der genmischen Sequenz von W08D2.4 (GenBank Zugangsnummer Z70271) identisch. Trotzdem war das Genprodukt kürzer als die vorgesagte Proteinsequenz. Die Kodone für die Aminosäurereste 38 bis 67 von W08D2.4 waren in der cDNA nicht vorhanden. In beiden Fällen scheint es so, daß die im Rahmen des genmischen Sequenzierungsprojektes verwendete Genvorhersage-Software eine intron DNA als kodierende Sequenz missidentifiziert hat.

#### Vergleichendes Beispiel 11: Sequenzvergleiche für *C. elegans* $\Delta^5$

**[0128]** Die *C. elegans* FAT3 and FAT4 Proteine, die *Mortierella alpina*  $\Delta^5$ -Desaturase und die *B. officinalis*  $\Delta^6$ -Desaturase scheinen Proteine von ähnlicher Struktur zu sein, da sie alle eine N-terminale Cytochrom b5 Domäne, drei Histidin-Boxen und deutliche hydrophobe Membran durchlaufende Domänen (vorhergesagt vom TMHMM des Center for Biological Sequence-Analysis, Technical University of Denmark (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-1.0/>) enthalten. Die vorhergesagte Struktur ist mit dem vorgeschlagenen Desaturase-Strukturmodell (Stukey et al., J. Biol. Chem. 265:20144-20149, 1990) konsistent. Trotz dieser Ähnlichkeiten ist die Gesamt-Ähnlichkeit zwischen den vier Proteinen recht gering. So weißt die FAT3  $\Delta^6$ -Desaturase im Vergleich zur Borretsch  $\Delta^6$ -Desaturase lediglich 28 % Identität bei den Aminosäuren auf. Das FAT4 Genprodukt ist zur Borretsch  $\Delta^6$ -Desaturase zu 25 % der Aminosäuren identisch und zu 19 % der Aminosäuren mit der *Mortierella alpina*  $\Delta^5$ -Desaturase. Der einzige Abschnitt des FAT4 Proteins, der größere Homologie zur *M. alpina*  $\Delta^5$ -Desaturase zeigt, ist eine Sequenz von 36 Resten innerhalb der dritten His-Box, die zu 44 % identisch und zu 56 % ähnlich sind. Die am engsten verwandten Sequenzpaare sind FAT3 und FAT4, die auf der Ebene der Aminosäuren zu 46 % identisch und über die gesamte cDNA Sequenz zu 54 % identisch sind.

**[0129]** [Fig. 9](#) zeigt den Sequenzvergleich der Borretsch  $\Delta^6$ -Desaturase, der *C. elegans* FAT3, der *C. elegans* FAT4 und der *Mortierella alpina*  $\Delta^5$ -Desaturase. Die ähnlichen Häm-Bindungsdomänen (HPGG) und die drei Histidin-Boxregionen sind unterstrichen. Das Vorhandensein dieser konservierten Motive weißt darauf hin, daß das fat-4 Gen ein Desaturase oder ein verwandtes Fettsäuremodifizierendes Enzym kodiert. Trotz Allem ist es auf Grundlage dieser Sequenzvergleiche allein nicht möglich vorherzusagen, ob diese Gene eine  $\Delta^6$ -Desaturase,  $\Delta^5$ -Desaturase oder weiter entfernt verwandte Enzyme kodieren.

#### Vergleichendes Beispiel 12: Fettsäure Desaturase Aktivität und Substrat Spezifität in Hefe für *C. elegans* $\Delta^5$

**[0130]** Um die enzymatische Aktivität des FAT4 Desaturase-ähnlichen Proteins zu bestimmen, wurde das Protein in *Saccharomyces cerevisiae*, ergänzt mit mehrfach-ungesättigten Fettsäuresubstraten, die normaler Weise nicht in der Hefe vorhanden sind, exprimiert. Das FAT4 Protein wurde im Hefe Expressionsvektor pYES2 unter dem GAL 1 Promotor durch Kultivierung der Zellen in Gegenwart von Galactose und verschiedenen Fettsäuren exprimiert. Nach 16 Stunden Wachstum wurden die Zellen auf ihre Gesamt-Fettsäurezusammensetzung durch Gaschromatographie (GC) analysiert. Der Vergleich von Zellen, die mit Di-homo- $\gamma$ -inolsäure (20:3  $\Delta^{8,11,14}$ ) enthaltend pYES2 mit der für FAT4 kodierenden Sequenz ergänzt wurden mit solchen Zellen, die lediglich den Vektor alleine enthielten, belegten das Vorhandensein eines großen neuen Scheitelpunkts, der bei 14,49 Minuten in den Zellen eluiert, die FAT4 exprimieren ([Fig. 10B](#)). Der neue Scheitelpunkt

hat eine Retentionszeit, die zu der des authentischen Arachidonsäuremethylesters (20:4  $\Delta^{5,8,11,14}$ ) identisch ist und als Arachidonsäure (20:4  $\Delta^{5,8,11,14}$ ) identifiziert werden konnte, da sein Massenspektrum zu dem von authentischem Arachidonsäuremethylester identisch ist, einschließlich eines Massenionen Peaks bei m/z 318.

**[0131]** Die Identität dieser Verbindung konnte weiterhin durch Konversion des Hefe-Fettsäuremethylesters in Oxazolin Derivate verifiziert werden, wodurch strukturspezifische Massenspektren erhalten werden konnten, die die Bestimmung der Positionen von Doppelbindungen im Kohlenwasserstoffketten vereinfacht. Das Massenspektrum des DMOX Derivates der neuen 20:4 Verbindung stimmte mit dem produzierten Spektrum für Arachidonsäure überein und enthielt einen prominenten Scheitelpunkt bei m/z 153, der für eine Doppelbindung an der  $\Delta^5$ -Position diagnostisch ist. Darauf basierend wurde geschlossen, daß das fat-4 Gen für eine  $\Delta^5$ -Desaturase kodiert, die zur Synthese von Arachidonsäure aus dem Substrat Di-homo- $\gamma$ -linolensäure in der Lage ist. Im Gegensatz dazu zeigte das FAT4 Protein keine Aktivität, wenn Linolensäure (18:2  $\Delta^{9,12}$ ) oder  $\gamma$ -linolensäure (18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ) als Substrate bereitgestellt wurden, was das Fehlen einer  $\Delta^6$ -Desaturase Aktivität indiziert.

**[0132]** Die weitere Analyse der GC-Spur der Gesamt-Fettsäuren von FAT4 exprimierenden Hefezellen führte zur Entdeckung eines zweiten neuen Scheitelpunktes, der bei 12,91 Minuten eluiert und der in den leeren Vektor enthaltenden Kontrollzellen nicht vorhanden war. Eine Analyse des Massenspektrums dieses neuen Scheitelpunktes führte zur Entdeckung einer molekularen Ionenspezies von 294, die zu der eines Methylesters einer 18-Kohlenstofffettsäure mit zwei Doppelbindungen (18:2) identisch ist, wobei jedoch die Retentionszeit und das Massenspektrum zum gewöhnlichen Isomer 18:2  $\Delta^{9,12}$  nicht identisch waren.

**[0133]** Es konnte bisher gezeigt werden, daß  $\Delta^5$ -Desaturaseaktivität in mikrosomalen Extrakten der Leber von Säugetieren bei einer Reihe von 18- und 20-Kohlenstoffvorläufermolekülen zur Produktion ungewöhnlicher Fettsäuren, wie 18:2  $\Delta^{5,11}$ , 20:3  $\Delta^{5,11,14}$  und 20:4  $\Delta^{5,11,14,17}$  führt (28, 29). Es ist auch gezeigt worden, daß zwei Arten des Schleimpilzes kleine Mengen von 18:2  $\Delta^{5,9}$ , 18:2  $\Delta^{5,11}$ , 20:3  $\Delta^{5,11,14}$  und 20:4  $\Delta^{5,11,14,17}$  produzieren (Rezanka, Phytochemistry 33:1441-1444, 1993). Diese Fettsäuren können als ungewöhnlich bezeichnet werden, da ihr Doppelbindungen nicht den konventionellen Methylen- unterbrochenen Muster (eine Doppelbindung alle drei Kohlenstoffatome) folgen.

**[0134]** Daher wurde vermutet, daß der neue Scheitelpunkt im GC-Spektrum das Ergebnis einer *C. elegans*  $\Delta^5$ -Desaturase sei, die ein 18:1  $\Delta^9$  oder [ 18:1  $\Delta^{11}$ , die in *S. cerevisiae* 15 % bis 20 % des Gesamt 18:1 ausmacht] umsetzt, um das ungewöhnliche Isomer 18:2  $\Delta^{5,9}$  oder 18:2  $\Delta^{5,11}$  zu produzieren. Diese Hefe-Fettsäuremethylester werden in Oxazolin-Derivate überführt. Es wurde gefunden, daß das Massenspektrum des DMOX-Derivates der neuen 18:2 Verbindung den  $\Delta^5$  spezifischen Scheitelpunkt bei m/z 153 enthielt. Auf Grund der geringen Menge dieses Moleküls im Gesamt-Hefeextrakt konnten die größeren Ionen-Scheitelpunkte, die für Doppelbindungen in der  $\Delta^9$ - oder  $\Delta^{11}$ -Position charakteristisch sind nicht detektiert werden.

**[0135]** Um zu testen, ob die *C. elegans*  $\Delta^5$ -Desaturase zur Desaturierung anderer Substrate unter Herstellung weiterer ungewöhnlicher, nicht Methylen-unterbrochener Fettsäure in der Lage war, wurde die die FAT4 Desaturase exprimierende Hefe mit unkonventionellen  $\Delta^5$ -Substraten, wie 20:1  $\Delta^{11}$ , 20:2  $\Delta^{11,14}$  und 20:3  $\Delta^{11,14,17}$  ergänzt. Wenn das Substrat 20:1  $\Delta^{11}$  den Hefen gefüttert wurde, so wurden keine weiteren Peaks gefunden. Wurden jedoch 20:2  $\Delta^{11,14}$  und 20:3  $\Delta^{11,14,17}$  als Substrate bereitgestellt, so wurden neue Peaks detektiert, die bei 14,62 Minuten bzw. 14,60 Minuten eluierten ([Fig. 11A](#) bzw. [Fig. 11B](#)). Die Massenspektrenanalyse der DMOX-Derivate dieser Moleküle lieferte Ergebnisse, die mit den publizierten Werten für 20:3  $\Delta^{5,11,14}$  und 20:4  $\Delta^{5,11,14,17}$  übereinstimmen, einschließlich eines hervorgehobenen Ionenpeaks von m/z 153 (der für Doppelbindungen in der  $\Delta^5$ -Position diagnostisch ist). Es wurde jedoch gefunden, daß diese Fettsäuren nicht im gleichen Maße wie Arachidonsäure (20:4  $\Delta^{5,8,11,14}$ ) produziert wurden ([Fig. 12](#)). In diesen Experimenten wurden 55 % der exogen bereitgestellten Di-homo- $\gamma$ -linolensäure (20:3  $\Delta^{8,11,14}$ ) in Arachidonsäure umgewandelt, während nur 5 %, 27 % und 26 % der 18:1, 20:3  $\Delta^{11,14}$  und 20:2  $\Delta^{11,14,17}$  Substrate umgesetzt wurden ([Fig. 12](#)).

**[0136]** Das fat-3 Gen wurde in dem Hefe Expressionsvektor pMK195, enthaltend den konstitutiven ADH Promotor, exprimiert. Das FAT3 Protein war zur Desaturierung von Linolensäure (18:2  $\Delta^{9,12}$ ) in  $\gamma$ -Linolensäure (18:3  $\Delta^{6,9,12}$ ) in der Lage, was mit veröffentlichten Ergebnissen übereinstimmt (Napier et al., Biochem. J. 330:611-614, 1998). Es wurde ebenfalls gefunden, daß FAT3 zur Desaturierung von  $\alpha$ -Linolensäure (18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ) in 18:4  $\Delta^{6,9,12,15}$  in der Lage war, was einer häufigen Reaktion in Tieren entspricht. Das FAT3 Protein zeigte Aktivität bei 20:1  $\Delta^{11}$ , 20:2  $\Delta^{11,14}$ , 20:3  $\Delta^{8,11,14}$  oder 20:3  $\Delta^{11,14,17}$ . Daher konnten die Substrat-Spezifitäten der *C. elegans*  $\Delta^5$ - und  $\Delta^6$ -Desaturasen als spezifisch und nicht überlappend bestimmt werden.

Beispiel 13: Diskussion der E. gracilis  $\Delta^8$ -Desaturase

**[0137]** Eine Desaturierung an der  $\Delta^8$ -Position ist bisher für keines der in der Vergangenheit klonierten Gene berichtet worden (Tocher et al., Prog. Lipid Res. 37: 73-117, 1998).

**[0138]** Das vorhergesagte EFD1 Protein hat eine 33 %ige Aminosäureidentität sowohl mit FAT3 als auch mit FAT4 ([Fig. 9](#)), während seine Identität mit der Borretschen  $\Delta^6$ -Desaturase 28 % beträgt. Die höchste Sequenzkonservierung findet sich in den His-Box-Motiven, die für die Desaturase-Aktivität von kritischer Bedeutung sind, höchstwahrscheinlich weil sie als Dieisen-oxo-Komponente des aktiven Zentrums fungieren (Shanklin et al., Biochemistry 33: 12787-12794, 1994). Eine Sequenzkonservierung ist auch in der N-terminalen Cytochrom b5-ähnlichen Domäne evident, wobei die meisten der essentiellen Reste des Cytochrom b5 (Lederer, Biochimie 76: 674-692, 1994), die in FAT3 und in FAT4 erhalten sind auch im EFD1 Protein enthalten sind ([Fig. 3](#)).

**[0139]** Die Expression des EFD1-Gens in Hefe wurde zur Charakterisierung seiner Aktivität verwendet. Drei verschiedene 20-Kohlenstoffsubstrate mit Doppelbindungen an der  $\Delta^{11}$ -Position wurden desaturiert ([Fig. 4](#)) und eine Analyse der Produkte zeigte, daß eine Desaturierung für jedes der Substrate an der  $\Delta^8$ -Position stattgefunden hat ([Fig. 5](#)). Die klonierte Euglena Desaturase zeigte eine klare Präferenz für das Substrat mit metabolischer Signifikanz mit mehr als zweifacher Präferenz für 20:2 und 20:3 gegenüber 20:1 (Ulsamer et al., J. Cell Biol. 43: 105-114, 1969). Obwohl EFD1 im Vergleich zu anderen mikrosomalen Desaturasen recht ähnlich ist, war seine Aktivität spezifisch, wie sich aus Inaktivität gegenüber Substraten für  $\Delta^5$ - und  $\Delta^6$ -Desaturierung ergibt ([Fig. 12](#)).

**[0140]** Die 20-Kohlenstoffsubstrate für eine  $\Delta^8$ -Desaturierung sind in heterotroph kultiviertem E. gracilis in Überschuß vorhanden ([Fig. 2](#)). Die gleichen Substrate sind auch in Säugern erhältlich, da 20:2 und 20:3 durch Elongation aus 18:2 und 18:3 produziert werden, in Konkurrenz zur typischen  $\Delta^6$ -Desaturierung ([Fig. 1](#)). Markierungsexperimente mit Rattenleberhomogenaten zeigen, daß die Elongation der 18-Kohlenstofffettsäuren fünfmal schneller verläuft als die konkurrierende Desaturierung (Pawlosky et al., J. Lipid Res. 33: 1711-1717, 1992).

**[0141]** Dem gegenwärtigen Verständnis des  $\Delta^6$ -Reaktionsweges der Biosynthese von 20-Kohlenstoff-mehr-fach-ungesättigten-Fettsäuren ist ein Zurückgreifen auf alternative Desaturierung und Elongation zur Kontrolle des Flux durch den Reaktionsweg implizit. Während die Elongation häufig nicht spezifisch zu sein scheint sind die meisten Desaturierungen sowohl bezüglich der Kettenlänge des Substrates und des vorhandenen Desaturierungsmusters der Fettsäure spezifisch (Heinz, Lipid Metabolism in Plants, S. 33-89, 1993). Allerdings zeigen Daten aus Experimenten in Säugetiergebenen (Bernert and Sprecher, Biochim. Biophys. Acta 398:354-363, 1975; Albert et al., Lipids 14:498-500, 1979) und mit dem C. elegans  $\Delta^5$ -Desaturasegen exprimierender Hefe ([Fig. 12](#)), daß  $\Delta^5$ -Enzyme Fettsäuren mit einer Doppelbindung in  $\Delta^{11}$ -Position desaturieren, nicht jedoch solche mit einer Doppelbindung in  $\Delta^5$ -Position, wobei nicht-Methylen-unterbrochene 20:3 und 20:4 Verbindungen bei signifikanten Syntheseraten produziert werden. Für den  $\Delta^8$ -Reaktionsweg findet die  $\Delta^8$ -Desaturierung der Substrate 20:2 und 20:3 in Konkurrenz mit der  $\Delta^5$ -Aktivität statt. Trotz dieser Promiskuität der  $\Delta^5$ -Enzyme enthalten Lipidprofile von Säugetiergebenen keine Fettsäure mit dem  $\Delta^{5,11}$ - (Heinz, Lipid Metabolism in Plants, S. 33-89, 1993; and Ulsamer et al., J. Cell Biol. 43:105-114, 1969) Desaturierungsmuster und sie können auch nicht in Euglena nachgewiesen werden.

**[0142]** Eine Erklärung könnte darin bestehen, daß die  $\Delta^8$ -Desaturierung der gewöhnlichen Substrate äußerst schnell während die  $\Delta^5$ -Desaturierung langsamer abläuft, so daß nur wenig  $\Delta^{5,11}$ -Produkt gebildet wird. Diese Erklärung wird dadurch unterstützt, daß die in Hefe exprimierte Euglena  $\Delta^8$ , eine sehr aktive Desaturase zu sein scheint im Vergleich zu ähnlich stark exprimierten  $\Delta^5$ -Desaturase-Enzymen. Die Euglena-Desaturase muß ausreichend aktiv sein, um für alle mehrfach-Desaturierungen langer Ketten in schnell wachsenden Euglena-Kulturen verantwortlich zu sein ([Fig. 2](#)). Im Gegensatz dazu sind die gemessenen Raten der  $\Delta^8$ -Desaturierung in Säugetiergebenen relativ langsam. Die höchste meßbare Rate kann in kanzerösem Gewebe ohne  $\Delta^6$ -Aktivität beobachtet werden, wo eine  $\Delta^8$ -Desaturierung die Produktion von Arachidonsäure bei nur 17 % des Niveaus vergleichbarer normaler Zellen mit  $\Delta^6$ -Aktivität erlaubt (Grammatikos et al., Br. J. Cancer 70:219-227, 1994).

**[0143]** Alternativ wäre es möglich, daß Fehlen von  $\Delta^{5,11}$  ungesättigten Fettsäuren in Membranen dadurch zu erklären, daß die  $\Delta^8$ -Desaturase diese Fettsäuren zur Desaturierung akzeptiert. Die Konvention, das die  $\Delta^8$ -Desaturierung der  $\Delta^5$ -Aktivität vorangeht ([Fig. 1](#)) basiert auf der Beobachtung von Desaturierungsreaktionen, die sequentiell längs der Fettsäurekohlenwasserstoffkette stattfinden. Die umgekehrte Reihenfolge der Desaturierung, mit der die  $\Delta^5$ -Saturierung der  $\Delta^8$ -Desaturierung vorangehend, ist für Säugetierleber vorgeschla-

gen worden (Takagi, J. Chem. Bull. Japan 38:2055-2057, 1965) und abgelehnt worden (Schlenk et al., Lipids 5:575-577, 1970) und auf der Basis von Experimenten mit deuterierten Substraten in Gliomzellen als wahrscheinlicher Reaktionsweg vorgeschlagen worden (Cook et al., J. Lipid Res. 32:1265-1273, 1991).

**[0144]** In Euglena können die Produkte der  $\Delta^8$ -Desaturierung, nämlich 20:3  $\Delta^{8,11,14}$  und 20:4  $\Delta^{8,11,14,17}$  direkt in die Membranen inkorporiert werden oder einer Desaturierung an der  $\Delta^5$ -Position unterzogen werden, um Arachidonsäure und Eikosapentaensäure zu produzieren (Hulanicka et al., J. Biol. Chem. 239:2778-2787, 1964). Weitere Elongation und Desaturierung führt zu verschiedenen mehrfach ungesättigten 22-Kohlenstoff Fettsäuren ([Fig. 2](#)). In Säugetieren produzieren ähnliche Prozesse zumeist Arachidonsäure, Eikosapentaensäure und Dekosahexaensäure (22:6 (Hwang, Fatty Acids in Foods and Their Health Implications, S. 545-557, 1992; Bernert and Sprecher, Biochim. Biophys. Acta 398:354-363, 1975; Lees and Korn, Biochemistry 5:1475-1481, 1966; Albert and Coniglio, Biochim. Biophys. Acta 489:390-396, 1977; Bardon et al., Cancer Lett. 99:51-58, 1996; und Sprecher and Lee, Biochim. Biophys. Acta. 388:113-125, 1975), unabhängig davon, ob die Produkte einer  $\Delta^8$  or  $\Delta^6$ -Aktivität entstammen, obwohl teilweise 20:3 direkt in Serie 1 Eikosanoid metabolische Regulatoren verstoffwechselt wird (Hwang, Fatty Acids in Foods and Their Health Implications, S. 545-557, 1992). (Hwang, Fatty Acids in Foods and Their Health Implications, S. 545-557, 1992).

**[0145]** Interessanterweise ist hinzuzufügen, daß der alternative Reaktionsweg der  $\Delta^8$ -Desaturierung mit einem Elongationsschritt beginnt. Diese Elongation ist der Standardreaktionsweg in Euglena, der erhebliche Mengen von 20:2 (7,4%) und 20:3 (1,4%) produziert ([Fig. 2](#)). In Geweben von Säugetieren mit wenig oder keiner  $\Delta^8$ -Aktivität (Grammatikos et al., Br. J. Cancer 70:219-227, 1994) wäre dies der erste Schritt, durch den die essentiellen Fettsäuren 18:2 und 18:3 in ihre 20-Kohlenstoffderivate verstoffwechselt werden. Kürzlich wurde der Verlängerung von Fettsäureketten als regulatorischer Schritt in der Fettsäurebiosynthese mehr Aufmerksamkeit geschenkt (Garcia et al., Lipids 25:211-215, 1990; Sprecher et al., Prostag. Leukot Essent. Fatty Acids 52:99-101, 1995). Hinweise darauf, daß Brustkrebszellen 18:3 bevorzugt über 18:2 selektiv elongieren könnten und daß eine  $\Delta^8$ -Desaturierung dieser Elongation folgt (Bardon et al., Cancer Lett. 99:51-58, 1996), impliziert, daß die  $\Delta^8$ -Desaturierung eine wichtige Rolle in einigen Krebszellen spielen könnte.

**[0146]** Die Identifizierung und Klonierung eines  $\Delta^8$ -Desaturase-Gens erlaubt die Untersuchung eines alternativen Reaktionsweges für die Biosynthese von 20-Kohlenstoff-mehrfachungesättigten Fettsäuren und wird Einsichten in den möglichen Reaktionsmechanismus der  $\Delta^8$ -Desaturierung ermöglichen. In Säugern könnte dieser alternative Reaktionsweg auf spezialisierte Gewebe beschränkt sein, in denen der Bedarf an mehrfach ungesättigten Fettsäuren das durch die geschwindigkeitsbestimmende  $\Delta^6$ -Desaturierung bereitgestellte Angebot übersteigt. Der Reaktionsweg könnte dort von größerer Bedeutung sein, wo  $\Delta^6$ -Desaturierung reduziert ist oder fehlt. Da der Fettsäuredesaturierungsmetabolismus in vielen Zelllinien gestört ist, und zwar sowohl in transformierten (Grammatikos et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 745:92-105, 1994) als auch in untransformierten Zellen (Rosenthal, Prog. Lipid Res. 26:87-124, 1987), ist es denkbar, daß die  $\Delta^8$ -Aktivität lediglich bei Fehlen einer  $\Delta^6$ -Aktivität erkennbar ist. In alternativer Weise könnte die  $\Delta^8$ -Aktivität mit Zellneoplasie auftreten oder sich verstärken. Die Isolierung und Untersuchung dieses  $\Delta^8$ -Genes und die Analyse seiner Substrat-Spezifität sollte die Ermittlung der Rolle der  $\Delta^6$ -Aktivität sowohl in normalen als auch in kanzerösen Säugergeweben erleichtern.

#### Vergleichendes Beispiel 14: Diskussion der *C. elegans* $\Delta^5$ -Desaturase

**[0147]** In diesem Beispiel wird eine Region des *C. elegans* Genoms bei Position 4.88 des Chromosoms IV beschrieben, das die  $\Delta^5$ - und  $\Delta^6$ -Desaturase Gene enthält. Die von den beiden Genen kodierten Aminosäuresequenzen sind zueinander 46 % identisch und jede enthält eine N-terminale Häm-bindende Domäne, die für das Elektronen-transportierende Cytochrom b<sub>5</sub> typisch ist, sowie Histidin-Boxen. Beide Gene enthalten die Konsensussequenz der dritten His-Box (QXXHH; SEQ. ID NO. 11), welche bislang für mikrosomale Desaturasen, die eine Rolle in der Einführung von Doppelbindungen in Kohlenstoffpositionen unterhalb Position 9 beteiligt sind, als einzigartig angesehen wird.

**[0148]** Trotz dieser Ähnlichkeiten zeigen die beiden mikrosomalen Desaturasen gar keine überlappende Substrat-Spezifität. Die *C. elegans*  $\Delta^6$ -Desaturase (FAT3) agiert spezifisch mit zwei 18-Kohlenstoffsubstraten, Linolsäure und  $\gamma$ -Linolsäure, wenn sie in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* überexprimiert wird und desaturiert immer in einem Methylenunterbrochenen Muster (eine Doppelbindung alle drei Kohlenstoffatome). Für das  $\Delta^6$ -Desaturase-System von Säugern konnte in ähnlicher Weise gezeigt werden, daß Doppelbindungen strikt gemäß einem Methylen-unterbrochenen Muster eingeführt werden und daß keine Aktivität für 20-Kohlenstoffsubstrate besteht (Schmitz et al., Lipids 12:307-313, 1997). Im Gegensatz dazu ist die *C. elegans*  $\Delta^5$ -Desaturase (FAT4) mit einer Reihe von 20-Kohlenstoffsubstraten aktiv, wie auch mit einer endogenen 18:1 Fettsäure von Hefe und zur Einführung von Doppelbindungen in einem nicht-Methylen-unterbrochenen Muster in der La-

ge.

**[0149]** Nicht-Methylen-unterbrochene Fettsäuren, wie  $20:2 \Delta^{5,11}$ ,  $20:3 \Delta^{5,11,14}$  und  $18:2 \Delta^{5,11}$  wurden in Säugerzellen durch Verfüttern von  $^{14}\text{C}$ -markierten Substraten an mit einer fettdefizienten Diät gezüchtete Ratten entdeckt (Ulman et al., Biochem. Biophys. Acta 248:186-197, 1971). Diese Fettsäuren sind jedoch als sogenannte "Sackgassen"-Metaboliten aufgefaßt worden, da für sie nicht gezeigt werden konnte, daß sie als Vorläufer für Signalmoleküle wie Prostaglandine fungieren, noch sind sie in Gewebelipiden von Ratten nachweisbar, die nicht mit einer fettdefizienten Diät präkonditioniert wurden. (Wir haben diese Fettsäuren ebenfalls nicht in *C. elegans* Lipidextrakten nachweisen können.) In das *C. elegans*  $\Delta^5$ -Desaturase Gen exprimierenden Hefen war die Menge an umgesetzten Substrat für das metabolisch signifikante Substrat  $20:3 \Delta^{8,11,14}$  am höchsten ([Fig. 13](#)).

**[0150]** Die desaturierte Menge von  $20:2 \Delta^{11,14}$  und  $20:3 \Delta^{11,14,17}$  war weniger als halb so groß wie die Menge von desaturiertem konventionellen Substrat. Dies mit Desaturierungsraten in mikrosomalen Extrakten aus Säugetierleber konsistent, in denen die Konversationsrate von markiertem  $20:2 \Delta^{11,14}$  zu  $20:3 \Delta^{5,11,14}$  41 % der Konversationsrate von markiertem  $20:3 \Delta^{8,11,14}$  zu  $20:4 \Delta^{5,8,11,14}$  beträgt (Bernet et al., Biochem. Biophys. Acta 398:354-313, 1975).

**[0151]** Die *C. elegans* fat-3 und fat-4 Gene sind innerhalb eines Genklusters in der gleichen 5' nach 3' Orientierung vorhanden. Im Gegensatz zu anderen Genklustern dieser Art in *C. elegans* ist das stromabwärts liegende fat-3 Gen nicht an SL2 transgespleißt und daher ist es unwahrscheinlich, daß es mit dem stromaufwärts liegenden fat-4 co-transkribiert wird. Die beiden Gene könnten auf Grund einer Gen-Duplikation benachbart zueinander liegen. Die DNA Sequenzen weisen über die gesamte cDNA kodierende Sequenz eine Identität von 54 % auf; die Gene weisen jedoch keine gemeinsamen Intron-/Exongrenzen auf ([Fig. 8](#)).

**[0152]** Dies ist die erste offenbare Sequenz eines  $\Delta^5$ -Desaturase-Gens aus einem Tier. Die Sequenz der *C. elegans*  $\Delta^5$ -Desaturase ist relativ weit von veröffentlichten bakteriellen und Pilz- $\Delta^5$ -Desaturasen entfernt und diese Tiersequenz sollte die Suche nach Desaturasekodierenden Sequenzen von Menschen und anderen Säugetieren erleichtern. Sowohl die  $\Delta^5$ - als auch die  $\Delta^6$ -Desaturasen sind wichtige regulatorische Enzyme in Menschen. Sie spielen eine wichtige Rolle in Reaktionswegen zur Produktion von Vorläufermolekülen für die Synthese von hormonähnlichen Eikosanoidmolekülen aus essentiellen Fettsäuren, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolsäure. Die Aktivitäten dieser Desaturasen sind sowohl unter hormoneller als auch ernährungsmäßiger Kontrolle demonstriert worden, aber die dieser Kontrolle zugrundeliegenden Mechanismen sind immer noch unbekannt.

**[0153]** Bestimmte Krankheiten wie Diabetes haben eine geringe  $\Delta^5$ -Desaturase-Aktivität zur Folge, während HTC Zellen, die aus einem von einem soliden Hepatom abgeleiteten Ascitestumor isoliert wurden, erhöhte  $\Delta^5$ -Desaturase-Aktivität zeigen. Die Verfügbarkeit von mutierenden und reversen genetischen Werkzeugen und das wachsende Wissen über Zell- und Entwicklungsbioologie in *C. elegans* lassen dies als ein attraktives System zur Untersuchung der Rollen von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren und ihrer metabolischen Produkte in Bezug auf Entwicklung, Reproduktion und andere zelluläre Prozesse von Tieren erscheinen.

Beispiel 15: Eine mit den  $\Delta^5$ - und  $\Delta^8$ -Desaturase-Genen der Erfindung transformierte Pflanzenzelle

**[0154]** Unter Verwendung der hierin beschriebenen Verfahren können  $\Delta^5$ - und  $\Delta^8$ -Desaturasen der vorliegenden Erfahrung kloniert und in Pflanzen exprimiert werden, so daß Pflanzen mit erhöhten Mengen von 20-Kohlenstoff-mehrachungsgesättigte-Fettsäuren bereitgestellt werden. Derartige Pflanzen stellen eine preiswerte und praktische Quelle dieser wichtigen Fettsäuren in einer leicht erntbaren und eßbaren Form dar.

**[0155]** Beispielsweise können die  $\Delta^5$ - und  $\Delta^8$ -Desaturasen der Erfahrung in eine gewöhnliche Anbaupflanze kloniert werden, sowie Mais, Weizen, Kartoffel, Tomate, Yamswurzel, Äpfel, Birnen oder in Ölsaattipflanzen wie Sonnenblume, Raps, Soja oder Erdnusspflanzen. Die resultierenden Pflanzen würden das geeignete Enzym zur Bildung von 20-Kohlenstoff-mehrachungsgesättigte-Fettsäuren exprimieren. Im Fall einer Ölsaattipflanze würde das Saatöl eine reichhaltige Quelle von 20-Kohlenstoff-mehrachungsgesättigten-Fettsäuren darstellen.

**[0156]** Die klonierten  $\Delta^5$ - und  $\Delta^8$ -Desaturase-Gene können entweder einzeln oder zusammen in einer Wirtspflanzenzelle exprimiert werden. Die korrespondierenden Desaturasen können unter Verwendung einer Vielzahl von verschiedenen Kontrollsequenzen wie Promotoren, Enhancern und 3'-Terminierungssequenzen exprimiert werden. Diese Kontrollsequenzen können zur Kontrolle der Expression jeder einzelnen Desaturase verwendet werden. beispielsweise kann die  $\Delta^5$ -Desaturase so kloniert werden, daß sie sich unter der Kontrolle eines starken Promoters befindet und die  $\Delta^8$ -Desaturase kann so kloniert werden, daß sie unter der Kontrolle

eines schwachen Promotors steht, wodurch eine transgene Pflanze erzeugt wird, die mehr  $\Delta^5$ -Desaturase als  $\Delta^8$ -Desaturase exprimiert. Weiterhin kann eine Expressionskontrolle durch operatives Verbinden eines oder mehrerer der Desaturase-Gene mit einem Promotor erfolgen, der durch Aussetzen der Pflanzenzelle gegenüber einem entsprechenden regulatorischen Agents wie einem Inducer, einem Repressor, einem Derepressor oder inhibitorischen Agents aktiviert wird. Eine derartige Regulation ist oben ausgeführt worden. In alternativer Weise kann die Expression von nicht zusammenhängenden Genen durch Verbindung der Expression eines ersten Gens mit der Expression eines Inducers oder Derepressor-Moleküls, das die Expression eines zweiten Genes induziert oder dargestoppt, koordiniert werden.

**[0157]** Die Gene der Erfindung können in das Genom einer Pflanze (beispielsweise durch Agrobacterium-vermittelten T-DNA Transfer) oder eines Tieres (beispielsweise durch Verwendung eines Retrovirus mit breiter Wirtsspezifität, beispielsweise eines Adenovirusvektors) integriert werden, so daß die  $\Delta^5$ - und  $\Delta^8$ -Desaturasen der Erfindung als Teil des Genoms exprimiert werden. Für transgene Pflanzen kann der T-DNA Vektor verwendet werden, der zur Integration des Transgens ( $\Delta^5$  und/oder  $\Delta^8$ ) in das Wirtszellgenom führt.

**[0158]** Die Expression der  $\Delta^5$ - und  $\Delta^8$ -Desaturasen in einer Pflanze wie Arabidopsis kann beispielsweise durch Konstruktion eines Pflanzentransformationsvektors zur Einführung der cDNA der jeweiligen Desaturase in die Pflanze erfolgen. Der Vektor kann einen gewebespezifischen Promotor enthalten, so daß das Desaturase-Protein während der Saatentwicklung exprimiert wird. Beispiele von saatspezifischen Promotoren schließen den für Phaseolin (van der Geest und Hall, Plant Mol. Biol. 32:579-88, 1996) oder den Promotor für Napin (Stalberg et al., Plant Mol. Biol. 23: 671-83, 1993) ein. Andere saatspezifische Promotoren, die hier verwendet werden können, sind solche auf dem genomischen BAC-Klon T24A18 (LOCUS ATT24A18. (1999) 45980 bp Arabidopsis thaliana DNA chromosome 4, Zugangsnummer # AL035680, NID g449q0701) des Arabidopsis Genom befindliche. Diese Promotoren regulieren die Proteinexpression der Keimspeicherung in Arabidopsis. Andere Promotoren, die spezifisch Gene in Keimen exprimieren, wie solche beschrieben in (Parcy et al., Plant Cell 6:1567-1582, 1994) können ebenfalls verwendet werden. Die die Desaturase kodierenden Sequenzen und die Promotorsequenz enthaltenen Konstrukte können dann auf Standard Pflanzentransformations-T-DNA-Vektoren, ähnlich zu pART27 (Gleave, Plant Mol. Biol. 20:1203-1207, 1992), pGPTV (Becker et al., Plant Mol. Biol. 20:1195-7, 1992), oder pJIT119 (Guerineau et al., Plant Mol. Biol. 15:127-136, 1992) übertragen werden. Wenn die Pflanze mit zwei Konstrukten transformiert werden soll, beispielsweise einem für die  $\Delta^8$ -Desaturase- und dem anderen für die  $\Delta^5$ -Desaturase-kodierenden Konstrukt, dann ist es bevorzugt zwei verschiedene selektierbare Marker zu wählen, so daß nur eine doppelte Transformante regeneriert. Beispielsweise kann der Vektor enthaltend die  $\Delta^5$ -Desaturase so konstruiert sein, daß er das Kanamycin (nptII) Gen enthält und der Vektor enthaltend die  $\Delta^8$ -Desaturase kann so konstruiert sein, daß er das Phosphinothricin (bar) Gen enthält. Transformanten werden dann auf Kanamycin und Phosphinothricin enthaltendem Medium selektiert. Die Transformation von Arabidopsis kann leicht unter Verwendung des Agrobacterium-vermittelten Vakuum-Infiltrationsprozesses (Katajic et al., Mol. Gen. Genet. 245:363-70, 1994) oder der „floral dip“ Modifikation davon (Clough and Bent, Plant J. 16:735-43, 1998) erreicht werden, obwohl diverse andere Methoden auch häufig verwendet werden. Transgene Abkömmlinge werden durch Selektion mittels des geeigneten Antibiotikums oder Herbizids, entweder Kanamycin oder Phosphinothricin oder beiden durch Selektion identifiziert. Da die  $\Delta^8$ - und  $\Delta^5$ -Konstrukte verschiedene selektierbare Marker verwenden, können die doppelten Transformanten leicht isoliert werden. Die die transgene Selektion überlebenden Pflanzen werden zur Reife gezogen und ihre Samen geerntet. Die Samen der transformierten Pflanzen werden durch Isolation der Fettsäuremethylester gefolgt von Gaschromatographie analysiert, um deren Fettsäurekomposition zu bestimmen.

**[0159]** Pflanzen, die nur die  $\Delta^8$ -Desaturase exprimieren, werden die in Arabidopsisamen natürlich vorkommende 20:1  $\Delta^{11}$ -Fettsäure zu 20:2  $\Delta^{8,11}$  desaturieren. Keime, die von mit beiden Desaturasen doppelt transformierten Pflanzen geerntet wurden, werden zusätzlich das 20:2  $\Delta^{8,11}$ -Produkt der  $\Delta^8$ -Desaturase-Pflanzen in 20:3  $\Delta^{5,8,11}$  in Folge der Expression der  $\Delta^5$ -Desaturase konvertieren. Diese Veränderungen können anhand der Fettsäuremethylesteranalyse leicht nachgewiesen werden.

Beispiel 16: Eine mit den  $\Delta^5$ - und  $\Delta^8$ -Desaturase-Genen der Erfindung transformierte Hefezelle

**[0160]** Der cDNA Abschnitt von pJW541 (Wallis and Browse, Arch. Biochem. Biophys. 365:307-316, 1999) enthaltend die Euglena  $\Delta^8$ -Desaturase wurde mittels der Restriktionsenzyme EcoRI und Spe1 aus dem Plasmid ausgeschnitten. Daß das Insertrepresentierende gereinigte DNA-Fragment wurde in den Hefeexpressionsvektor pYX232 (R&D Systems, Inc.) ligiert, der durch Verdauung mit EcoRI und NheI verdaut worden war, so daß er über kompatible hybridisierende Enden verfügte. (Plasmid pYX232 trägt den Marker, der Hefe prototroph für Tryptophan macht (TRP1 Mutation) und verwendet den Triosephosphat-isomerase (TPI) Promotor zur konstitutiven Expression der insertierten DNA.) Das resultierende Plasmid, pYX232-541, wurde in den Sac-

*charomyces cerevisiae* Stamm eingeführt, der bereits das  $\Delta^5$ -Desaturase (pYFAT4; Watts and Browse, Arch. Biochem. Biophys. 362:175-182, 1999) Plasmid enthält, daß Hefe prototroph für Uracil macht und zwar unter Verwendung eines Lithiumazetat Transformationsprotokoll (Invitrogen). Transformanten wurden gleichzeitig für Uracil- und Tryptophan-Prototrophie selektiert. Nach der Transformation wachsende selektierte Kolonien wurden in Hefe-Minimalmedium inkuliert, in dem es sowohl an Uracil als auch an Tryptophan mangelte.

**[0161]** Zur Analyse der Aktivität wurden separate Kulturen mit einer von drei Fettsäuresubstraten, die als Natriumsalz, wie beschrieben, bereitgestellt wurden (Wallis and Browse, Arch. Biochem. Biophys. 365:307-316, 1999) ergänzt. Nach Kultivierung bei 28°C über Nacht wurden die Kulturen durch Zentrifugation geerntet und gewaschen. Mittels der Standardmethoden wie in Miquel and Browse J. Biol. Chem. 267:1502-1509, 1992 beschrieben, wurden Fettsäuremethylester hergestellt.

**[0162]** Eine gaschromatographische Analyse zeigte, daß jedes Substrat zweimal desaturiert worden war. Die Inkorporation der drei Substrate variierte, wobei stärker desaturierte Substrate einen größeren Anteil der Fettsäurekomposition der Zelle einnahmen, wie es auch in anderen Experimenten beobachtet wurde (Wallis and Browse, Arch. Biochem. Biophys. 365:307-316, 1999, und Watts and Browse, Arch. Biochem. Biophys. 362:175-182, 1999). Für das dreifach umgesetzte Substrat 20:3  $\Delta^{11,14,17}$  betrug die 20-Kohlenstoff-Fettsäure 37 % der gesamten zellulären Fettsäuren, für 20:2  $\Delta^{11,14}$  betrug der 20-Kohlenstoff-Fettsäureanteil 21 % und für 20:1  $\Delta^{11}$  erreichte der Fettsäureanteil nur 13 %. Trotzdem waren die Aktivitäten der Desaturasen gegenüber allen drei Substraten im Wesentlichen identisch. Zwischen 70 und 72 % des Substrates wurden nicht konvertiert und 17 oder 18 % wurden einer einzigen Desaturierung durch nur eines der Enzyme unterworfen. Für jedes Substrat wurden trotzdem zwischen 11 und 13 % des Substrates durch beide zusammenwirkende Enzyme desaturiert, um eine Fettsäure zu produzieren, die zwei Doppelbindungen mehr aufweist, als das Molekül des bereitgestellten Substrates.

Tabelle 2

Fettsäure-bereitstellung	Fettsäure-aufnahme*	Unkonvertiertes Substrat#	Eine weitere Desaturierung#	Doppelt desaturiertes Produkt#
20:3 (11,14,17)	37	71	17	11      20:5 (5,8,11,14,17)
20:2 (11,14)	21	70	18	13      20:4 (5,8,11,14)
20:1 (11)	13	72	18	11      20:3 (5,8,11)

\*als Massenprozent der gesamten Zellfettsäuren  
#als Massenprozent der inkorporierten 20-Kohlenstoff-Fettsäuren

**[0163]** Die voranstehenden Ausgestaltungen und Beispiele werden lediglich als Beispiele bereitgestellt und sind in keiner Weise als den Umfang der beanspruchten Erfindung limitierend anzusehen.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Browse, John et al.

&lt;120&gt; Desaturasen und Verfahren ihrer Anwendung zur Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren

&lt;130&gt; W10404

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; 60/111, 301

&lt;151&gt; 1998-12-07

&lt;160&gt; 13

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1461

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Caenorhabditis elegans

&lt;400&gt; 1

&lt;400&gt; 1

```

gaattttcaa tcctccttgg gtcccacccgc tggatcatca aaatggattt acgagagcaa 60
gaggatgagc cattttcat taaaatttggat ggaaaaatggt gtcaatttga cgatgtgtc 120
ctggatcac atccagggtgg tagtgcaattt actacccataaaaatggta tgccactacc 180
gtattccaca cattccatac tggttctaaa gaagcgatc aatggctgac agaattgaaa 240
aaagagtggcc ctacacaaga accagagatc ccagatatttta aggatgaccc aatcaaagga 300
attgtatgtg tgaacatggg aactttcaat atttctgaga aacgatctgc ccaaataaat 360
aaaagttca ctgatctacg tatgcgagtt cgtgcagaag gacttatggta tggatctcct 420
ttgttctaca ttagaaaaat tcttgaacaatc atttcacaaa ttcttttgc attctacctt 480
caataccaca catattatct tccatcagct attctaatttgg gagttgcgtg gcaacaattt 540
ggatggtaa tccatgaattt cgccatcatc cagttgttca aaaacagata ctacaatgtat 600
ttggccagct atttcgttgg aaacttttta caaggattctt catctgggtt ttggaaagag 660
cagcacaatg tgcacacgc agccacaaat gttgttggac gagacggaga tcttgattta 720
gtcccattct atgctacagt ggcagaacat ctcaacaattt attctcagga ttcatgggtt 780
atgactctat tcagatggca acatgttcat tggacattca tggttaccattt cctccgtctc 840
tcgtggcttc ttcatgtcaatt catttttggat agtcatgtc caactcatta ttatgactat 900
tacagaaata ctgcgattta tgaacaggtt ggtctctt tgcactgggc ttggtcattt 960
ggtaatttgtt atttccttacc cgattggta actagaataa tgttcttccct tgttctcat 1020
cttggggag gtttcctgct ctctcatgtt gttactttca atcatttttgc agtggagaag 1080
tttgcattga gctcgaacat catgtcaaat tacgcttgc ttcaaatcat gaccacaaga 1140
aatatgagac ctggaaagattt cattgactgg ctttggggag gtcttaacta tcagattgag 1200
caccatctt tcccaacgtt gccacgacac aacttgaaca ctgttatgcc acttggtaag 1260
gagtttgcag cagcaaattgg tttaccatc atggtcgacg attatttcac aggattctgg 1320
cttggaaatttgc agcaattccg aatatatttgc aatgttgcgtt cttaatttgc taaaaaagattt 1380
gccttagatta cgattaatta atcaattttt tttcatgttgc tattcgtgtt ttttaatattt 1440
ttccaaattt ttaccttattt c 1461

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 447

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Caenorhabditis elegans

&lt;400&gt; 2

## DE 699 35 162 T2 2007.11.22

Met Val Leu Arg Glu Gln Glu His Glu Pro Phe Phe Ile Lys Ile Asp  
 1 5 10 15

Gly Lys Trp Cys Gln Ile Asp Asp Ala Val Leu Arg Ser His Pro Gly  
 20 25 30

Gly Ser Ala Ile Thr Thr Tyr Lys Asn Met Asp Ala Thr Thr Val Phe  
 35 40 45

His Thr Phe His Thr Gly Ser Lys Glu Ala Tyr Gln Trp Leu Thr Glu  
 50 55 60

Leu Lys Lys Glu Cys Pro Thr Gln Glu Pro Glu Ile Pro Asp Ile Lys  
 65 70 75 80

Asp Asp Pro Ile Lys Gly Ile Asp Asp Val Asn Met Gly Thr Phe Asn  
 85 90 95

Ile Ser Glu Lys Arg Ser Ala Gln Ile Asn Lys Ser Phe Thr Asp Leu  
 100 105 110

Arg Met Arg Val Arg Ala Glu Gly Leu Met Asp Gly Ser Pro Leu Phe  
 115 120 125

Tyr Ile Arg Lys Ile Leu Glu Thr Ile Phe Thr Ile Leu Phe Ala Phe  
 130 135 140

Tyr Leu Gln Tyr His Thr Tyr Tyr Leu Pro Ser Ala Ile Leu Met Gly  
 145 150 155 160

Val Ala Trp Gln Gln Leu Gly Trp Leu Ile His Glu Phe Ala His His  
 165 170 175

Gln Leu Phe Lys Asn Arg Tyr Tyr Asn Asp Leu Ala Ser Tyr Phe Val  
 180 185 190

Gly Asn Phe Leu Gln Gly Phe Ser Ser Gly Gly Trp Lys Glu Gln His  
 195 200 205

Asn Val His His Ala Ala Thr Asn Val Val Gly Arg Asp Gly Asp Leu  
 210 215 220

Asp Leu Val Pro Phe Tyr Ala Thr Val Ala Glu His Leu Asn Asn Tyr  
 225 230 235 240

Ser Gln Asp Ser Trp Val Met Thr Leu Phe Arg Trp Gln His Val His  
 245 250 255

Trp Thr Phe Met Leu Pro Phe Leu Arg Leu Ser Trp Leu Leu Gln Ser  
 260 265 270

Ile Ile Phe Val Ser Gln Met Pro Thr His Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Arg  
 275 280 285

Asn Thr Ala Ile Tyr Glu Gln Val Gly Leu Ser Leu His Trp Ala Trp  
 290 295 300

Ser Leu Gly Gln Leu Tyr Phe Leu Pro Asp Trp Ser Thr Arg Ile Met

DE 699 35 162 T2 2007.11.22

305	310	315	320
Phe Phe Leu Val Ser His Leu Val Gly Gly		Phe Leu Leu Ser His Val	
325	330		335
Val Thr Phe Asn His Tyr Ser Val Glu Lys	Phe Ala Leu Ser Ser Asn		
340	345		350
Ile Met Ser Asn Tyr Ala Cys Leu Gln Ile Met Thr Thr Arg Asn Met			
355	360		365
Arg Pro Gly Arg Phe Ile Asp Trp Leu Trp Gly Gly Leu Asn Tyr Gln			
370	375		380
Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Thr			
385	390		395
Val Met Pro Leu Val Lys Glu Phe Ala Ala Ala Asn Gly Leu Pro Tyr			
405	410		415
Met Val Asp Asp Tyr Phe Thr Gly Phe Trp Leu Glu Ile Glu Gln Phe			
420	425		430
Arg Asn Ile Ala Asn Val Ala Ala Lys Leu Thr Lys Lys Ile Ala			
435	440		445

<210> 3  
<211> 1275  
<212> DNA  
<213> Euglena gracilis

<400> 3  
attttttttc gaaatgaagt caaagcgcca agcgcttatcc cccttacaat tgatggaaca 60  
aacatatgtat gtggtaatttccaccctgg tggtgccgaa attatacataa attaccaagg 120  
aaggatgcc actgatgcct tcattttttat gcactttcaa gaagccttcg acaagctcaa 180  
gcgcattccc aaaatcaatc ccagtttga gttgcaccc caggctgcag tgaatgaaagc 240  
tcaagaggat ttccggaaatc tccggagaaga gttgatcgca actggcatgt ttgatgcctc 300  
ccccctctgg tactcataca aaatcagcac cacactggc cttggagtgc tgggttattt 360  
cctgatggtt cagttatcaga tgtatccat tggggcagtg ttgcttggga tgcactatca 420  
acagatggc tggctttctc atgacatttgc ccaccaccc agttcaaga accgaaactg 480  
gaacaacctc gtgggactgg tatttggcaa tggctcgaa gtttttccg tgacatgtt 540  
gaaggacaga cacaatgcac atcattcggc aaccaatgtt caagggcacg accctgata 600  
tgacaacctc cccccccttag cctggctctga ggtatgacgatc acacggcgat caccgattt 660  
ccgcaagctc attcagttcc agcagttacta tttctggc atctgtatct ttttgcgtt 720  
catttggtgtt ttccagtgcg tggatggcgt ggcgcgttgc aaggacacatg ataaccaatt 780  
ctatcgctct cagttatcaga aggaggccat tggcctcgcc ctgcacttgaa ctttgaaggc 840  
cctgttccac ttattctta tgcccgatcat cctcacatcg ctgttggtgtt ttttgcgtt 900  
ggagctgggtt ggcggcttcg gcattgcgtat cgtgggttc atgaaccactt acccactgga 960  
gaagatcggtt gacccagtttgcgtat gggatggcctt tggatctcg gttggccaga tccatgagac 1020  
catgaacattt cggcgagggtt ttatcacaat tgggttttc ggaggcttgcgattt acccactgga 1080  
tgagcaccat ttgtggccgtt ccctccctcg ccacaacctg acagcggtt gctaccaggtt 1140  
ggaacagctg tgccagaagc acaacctgccc gtatcggttgcgatcccgatccatgaaatgggtt 1200  
ggtcattctgtt ctgcgtatc tggcggttgcgatcccgatcccgatccatgaaatgggtt 1260  
gaaggctcta taagg 1275

<210> 4

&lt;211&gt; 422

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Euglena gracilis

&lt;400&gt; 4

Met	Lys	Ser	Lys	Arg	Gln	Ala	Leu	Ser	Pro	Leu	Gln	Leu	Met	Glu	Gln
1				5				10				15			

Thr	Tyr	Asp	Val	Ser	Ala	Trp	Val	Asn	Phe	His	Pro	Gly	Gly	Ala	Glu
			20					25				30			

Ile	Ile	Glu	Asn	Tyr	Gln	Gly	Arg	Asp	Ala	Thr	Asp	Ala	Phe	Met	Val
		35				40				45					

Met	His	Phe	Gln	Glu	Ala	Phe	Asp	Lys	Leu	Lys	Arg	Met	Pro	Lys	Ile
		50			55				60						

Asn	Pro	Ser	Phe	Glu	Leu	Pro	Pro	Gln	Ala	Ala	Val	Asn	Glu	Ala	Gln
			65		70				75			80			

Glu	Asp	Phe	Arg	Lys	Leu	Arg	Glu	Glu	Leu	Ile	Ala	Thr	Gly	Met	Phe
			85			90				95					

Asp	Ala	Ser	Pro	Leu	Trp	Tyr	Ser	Tyr	Lys	Ile	Ser	Thr	Thr	Leu	Gly
			100				105			110					

Leu	Gly	Val	Leu	Gly	Tyr	Phe	Leu	Met	Val	Gln	Tyr	Gln	Met	Tyr	Phe
		115				120				125					

Ile	Gly	Ala	Val	Leu	Leu	Gly	Met	His	Tyr	Gln	Gln	Met	Gly	Trp	Leu
		130			135			140							

Ser	His	Asp	Ile	Cys	His	His	Gln	Thr	Phe	Lys	Asn	Arg	Asn	Trp	Asn
					145				150		155			160	

Asn	Leu	Val	Gly	Leu	Val	Phe	Gly	Asn	Gly	Leu	Gln	Gly	Phe	Ser	Val
				165				170				175			

Thr	Cys	Trp	Lys	Asp	Arg	His	Asn	Ala	His	His	Ser	Ala	Thr	Asn	Val
			180			185			190						

Gln	Gly	His	Asp	Pro	Asp	Ile	Asp	Asn	Leu	Pro	Pro	Leu	Ala	Trp	Ser
			195				200			205					

Glu	Asp	Asp	Val	Thr	Arg	Ala	Ser	Pro	Ile	Ser	Arg	Lys	Leu	Ile	Gln
			210			215				220					

Phe	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Val	Ile	Cys	Ile	Leu	Leu	Arg	Phe	Ile
			225			230			235				240		

Trp	Cys	Phe	Gln	Cys	Val	Leu	Thr	Val	Arg	Ser	Leu	Lys	Asp	Arg	Asp
			245				250		255						

Asn	Gln	Phe	Tyr	Arg	Ser	Gln	Tyr	Lys	Lys	Glu	Ala	Ile	Gly	Leu	Ala
			260			265				270					

Leu	His	Trp	Thr	Leu	Lys	Ala	Leu	Phe	His	Leu	Phe	Phe	Met	Pro	Ser
			275				280		285						

DE 699 35 162 T2 2007.11.22

Ile Leu Thr Ser Leu Leu Val Phe Phe Val Ser Glu Leu Val Gly Gly  
290 295 300

Phe Gly Ile Ala Ile Val Val Phe Met Asn His Tyr Pro Leu Glu Lys  
305 310 315 320

Ile Gly Asp Pro Val Trp Asp Gly His Gly Phe Ser Val Gly Gln Ile  
325 330 335

His Glu Thr Met Asn Ile Arg Arg Gly Ile Ile Thr Asp Trp Phe Phe  
340 345 350

Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Trp Pro Thr Leu Pro  
355 360 365

Arg His Asn Leu Thr Ala Val Ser Tyr Gln Val Glu Gln Leu Cys Gln  
370 375 380

Lys His Asn Leu Pro Tyr Arg Asn Pro Leu Pro His Glu Gly Leu Val  
385 390 395 400

Ile Leu Leu Arg Tyr Leu Ala Val Phe Ala Arg Met Ala Glu Lys Gln  
405 410 415

Pro Ala Gly Lys Ala Leu  
420

<210> 5  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (1) . . (27)  
<223> y = t oder c

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (1) . . (27)  
<223> n= a, t, c, oder g

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (1) . . (27)  
<223> r = a oder g

<400> 5  
ggctggctga cncaygartt ytgycay 27

<210> 6  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

```

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1) .. (30)
<223> n = a, t, g, oder c

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1) . . (30)
<223> r = a oder g

<220>
<221> VARIANTE
<222> (1) . . (30)
<223> y = t oder c

<400> 6
catcggttga aanarrtgrt gytcdatytg 30

<210> 7
<211> 41
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 7
cccggttgaac ttctcgagga attttcaatc ctccctgggt c 41

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 8
cccggttga tccggAACAT atcacacgaa acag 34

<210> 9
<211> 6
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Polyadenylierungssignal

<400> 9
aauaaa 6

<210> 10
<211> 20

```

<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR Primer

<400> 10  
tctggatct ctggttcttg 20

<210> 11  
<211> 9  
<212> RNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Histidin Box

<400> 11  
uuuuuuuucg 9

<210> 12  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Histidin Box

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (1) .. (5)  
<223> Xaa = jede Aminosäure

<400> 12  
His Xaa Xaa His His  
1 5

<210> 13  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Histidin Box

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (11 .. (5)  
<223> Xaa = jede Aminosäure

<400> 13  
Gln Xaa Xaa His His  
1 5

### Patentansprüche

1. Gereinigtes Protein, das eine Desaturase-Aktivität aufweist und eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
  - a) einer Aminosäuresequenz wie in SEQ ID NO: 4 gezeigt; und
  - b) einer Aminosäuresequenz, die mindestens 60 % Sequenzidentität zu der in a) angegebenen Sequenz aufweist

umfaßt.

2. Desaturase-Protein wie beansprucht in Anspruch 1, das mindestens 70 % Sequenzidentität zu SEQ ID NO: 4 aufweist.
3. Desaturase-Protein wie beansprucht in Anspruch 1, das mindestens 80 % Sequenzidentität zu SEQ ID NO: 4 aufweist.
4. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das für ein Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert.
5. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 4, umfassend eine Sequenz wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt.
6. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 4, das unter Bedingungen niedriger Stringenz mit einer Nukleinsäure-Sonde hybridisiert, wobei die Sonde eine Sequenz, ausgewählt aus der Sequenz wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt, umfaßt, und Fragmente davon von mindestens 600 Basenpaaren Länge.
7. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 6, das mindestens 60 % Sequenzidentität zu einer Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt aufweist.
8. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 6, das mindestens 70 % Sequenzidentität mit SEQ ID NO: 3 aufweist.
9. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Kontrollsequenz, die operativ mit dem Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 4 bis 8 verbunden ist.
10. Zelle, transformiert mit dem rekombinanten Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 9.
11. Zelle nach Anspruch 10, weiterhin transformiert mit einem Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
  - a) einem Nukleinsäuremolekül wie in SEQ ID NO: 1 gezeigt; und
  - b) einem Nukleinsäuremolekül, das mindestens 60 % Sequenzidentität zu dem Nukleinsäuremolekül wie in a) gezeigt aufweist.
12. Zelle nach Anspruch 10 oder 11, wobei die Zelle eine Pflanzenzelle ist.
13. Nicht-menschlicher transgener Organismus, umfassend die transformierte Zelle nach Anspruch 10 oder 11, wobei der transgene Organismus ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Pflanzen, Bakterien, Insekten, Pilzen und Säugern.
14. Verfahren zur Identifizierung einer Nukleinsäuresequenz, umfassend:
  - a) Hybridisieren der Nukleinsäuresequenz an mindestens 15 kontinuierliche Nukleotide einer Sequenz wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt; und
  - b) Identifizieren der Nukleinsäuresequenz als eine, die für eine Desaturase kodiert.
15. Verfahren nach Anspruch 14, umfassend ein Hybridisieren der Nukleinsäuresequenz an mindestens 20 kontinuierliche Nukleotide einer Sequenz wie in SEQ ID NO: 3 gezeigt.
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, wobei das Hybridisieren der Nukleinsäuresequenz unter Bedingungen niedriger Stringenz durchgeführt wird.
17. Verfahren nach Anspruch 14, wobei Schritt a) während einer PCR-Reaktion stattfindet.
18. Verfahren nach Anspruch 14, wobei Schritt a) während eines Bibliotheks-Screenings auftritt.
19. Verfahren zur Erzeugung einer Doppelbindung zwischen zwei Kohlenstoffen in einer Fettsäure, umfassend:  
In-Kontakt-Bringen einer Fettsäure mit mindestens einer gereinigten Desaturase nach Anspruch 1; und  
Ermöglichen der Desaturase, eine Doppelbindung zwischen zwei Kohlenstoffen zu erzeugen.
20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Desaturase in einem nicht-menschlichen transgenen Organis-

mus exprimiert wird und die Doppelbindungs-Bildung in vivo auftritt.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Desaturase in einem nicht-menschlichen Organismus exprimiert wird, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Eukaryonten und Prokaryonten.

22. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Desaturase in vitro exprimiert wird und die Doppelbindungs-Bildung in vitro auftritt.

23. Verfahren nach Anspruch 19, weiterhin umfassend Exprimieren einer zweiten Desaturase.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei die zweite Desaturase ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

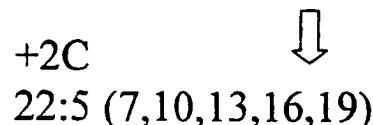
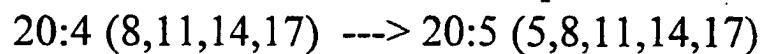
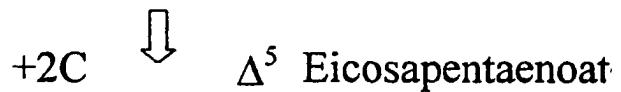
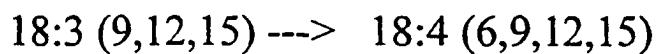
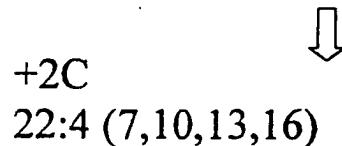
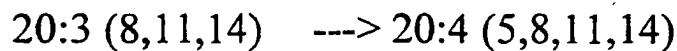
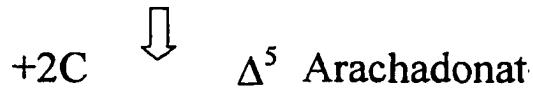
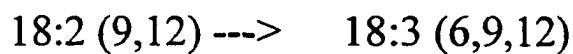
- a) einer Aminosäuresequenz wie in SEQ ID NO: 2 gezeigt;
- b) einer Aminosäuresequenz, die sich von der in a) angegebenen durch eine oder mehrere konservative Aminosäuresubstitutionen unterscheidet; und
- c) einer Aminosäuresequenz, die mindestens 60 % Sequenzidentität zu einer in a) oder b) angegebenen Sequenz aufweist.

Es folgen 21 Blatt Zeichnungen

---

**Δ-6 Reaktionsweg**

---

**ω-3 Fettsäuren** $\Delta^6$ **ω-6 Fettsäuren** $\Delta^6$ **FIG. 1A**

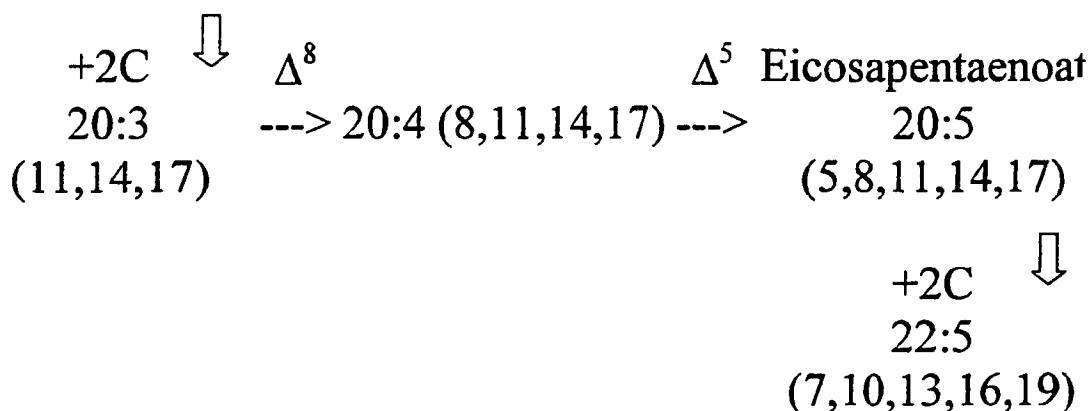
---

## $\Delta$ -8 Reaktionsweg

---

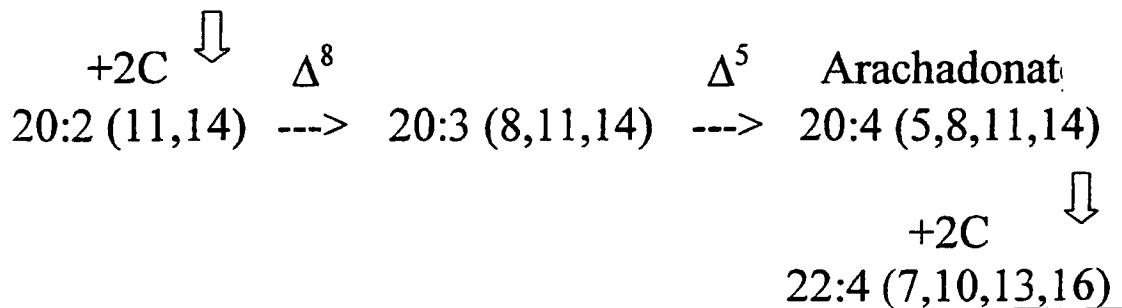
### $\omega$ -3 Fettsäuren

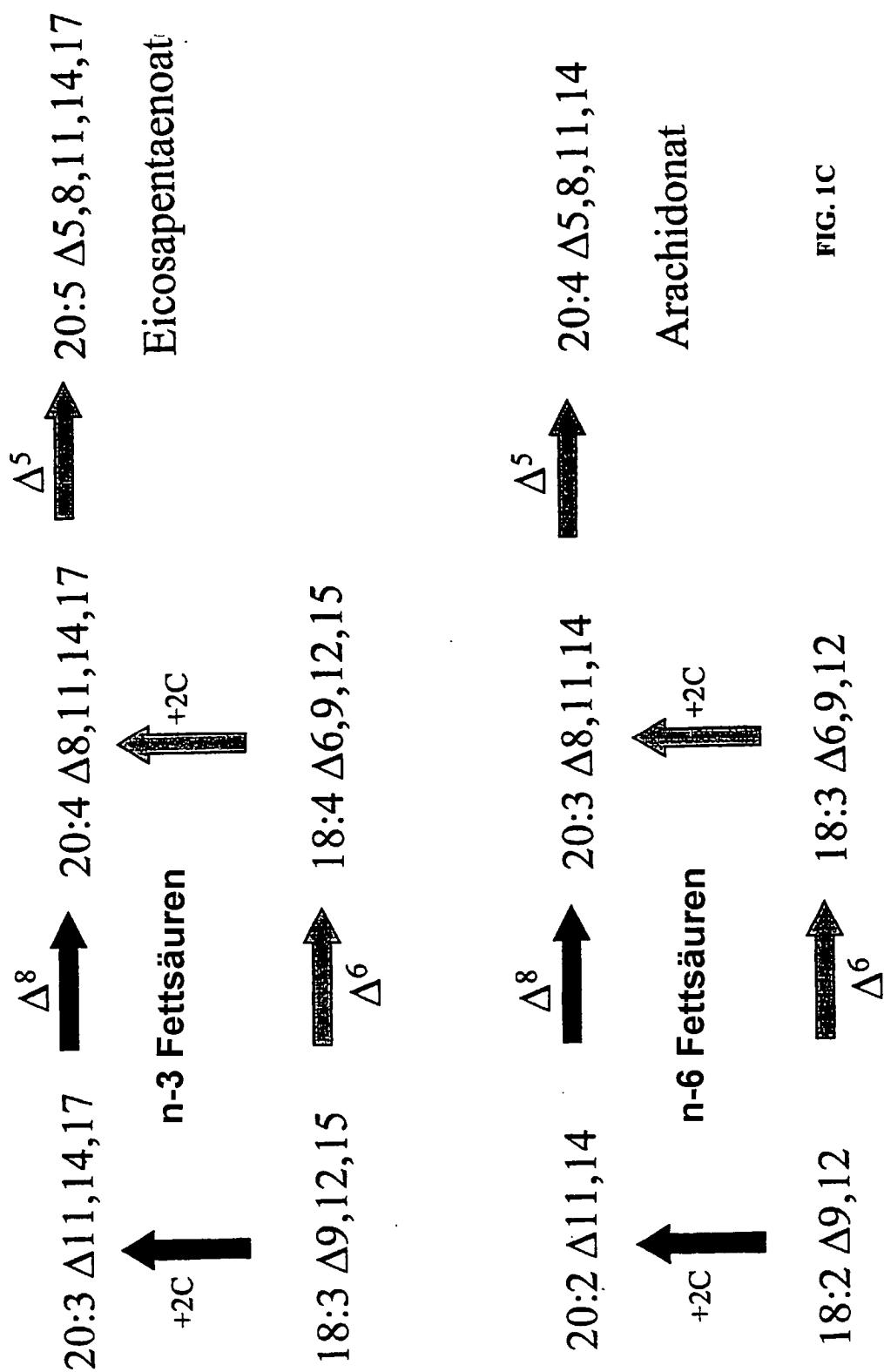
18:3 (9,12,15)

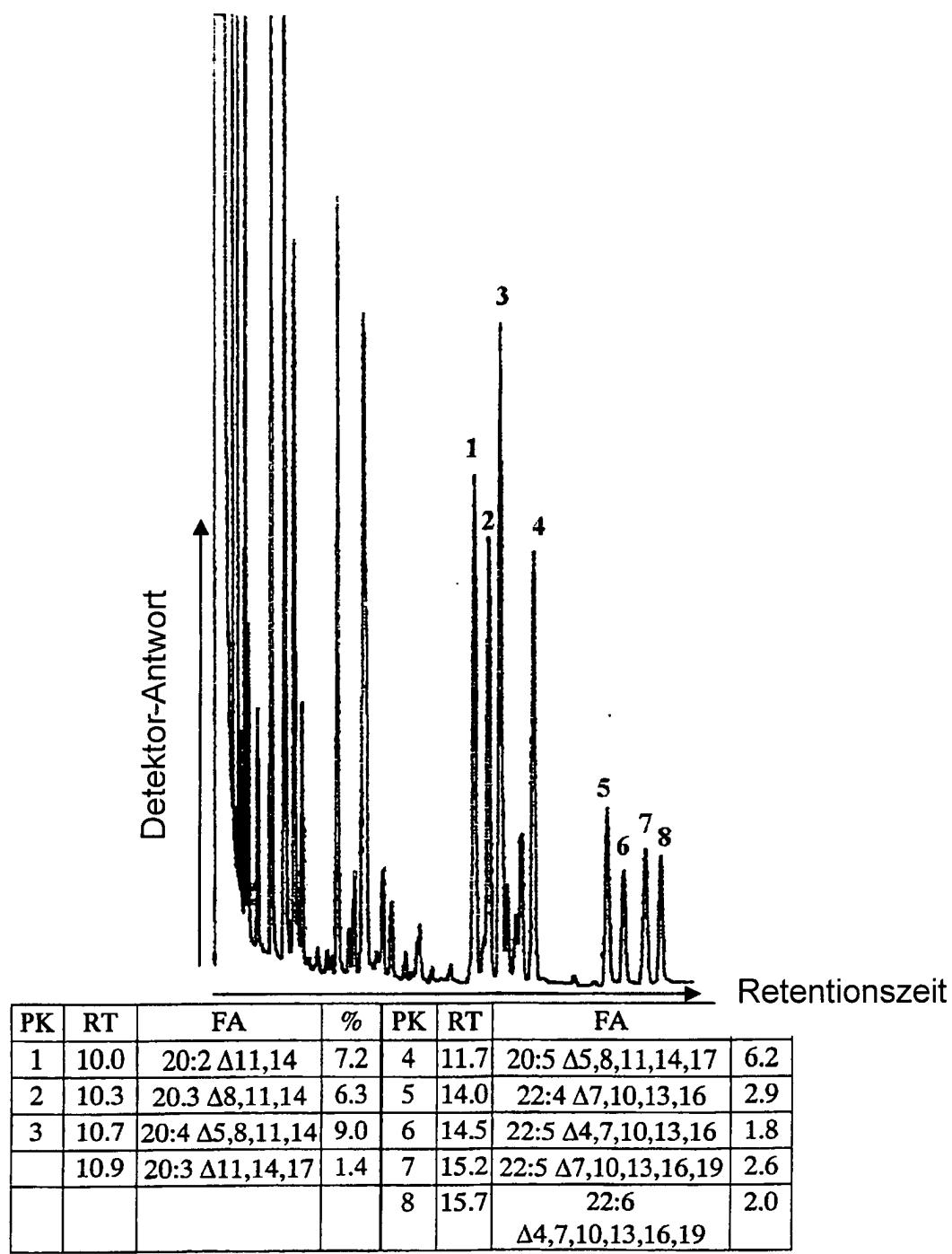


### $\omega$ Fettsäuren

18:2 (9,12)

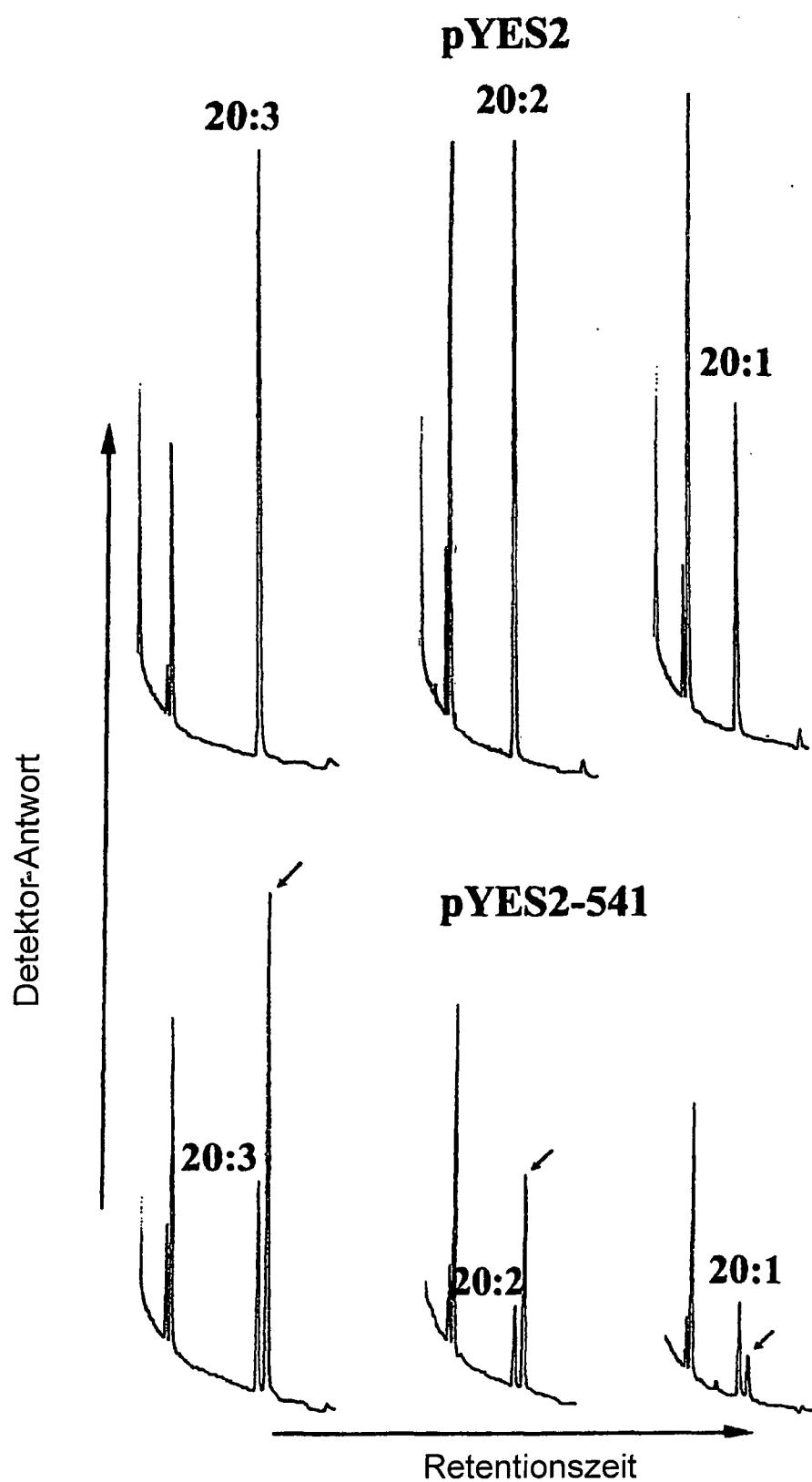
**FIG. 1B**





<b>fat-4</b>	1	MVLREQEHEPEEIKIDGKWCQIDD <del>AVLRSHPGGS</del> .AITTYKNMDATTVFHTFHTGSKEAY
<b>egd1</b>	1	MKS <del>KR</del> QALSPLOI <del>M</del> ...EQTYDVS <del>A</del> WNEHPGGAE <del>T</del> IENYQGRDATDAF <del>M</del> VH..FOCAF
<b>fat-3</b>	1	MVV.DKNASGLRMKV <del>D</del> GKWL <del>L</del> SEE <del>L</del> VKKHPGGA.VIEQYRN <del>S</del> DATHIFHAF <del>H</del> EGSSQAY
		W HPGG G F H
Cytochrom b <sub>5</sub> -ähnliche Domäne		
<b>fat-4</b>	60	QWLTELKKC <del>C</del> PTQEP <del>E</del> IPD <del>I</del> KDDPIKGIDDVNMGTENISEKRSAQI <del>N</del> KSF <del>T</del> DLRMVRRAE
<b>egd1</b>	56	DKLKRM <del>P</del> K.....INPSFELPPOAAVNEAQEDFRKLREEIAT
<b>fat-3</b>	59	KO <del>D</del> LLKKH..GEHDEFLEKOLEKRLDKVDINVSAMDVSV <del>A</del> QEKK <del>N</del> VESEKLR <del>O</del> KLHDD
<b>fat-4</b>	120	GLMDGSPLFYIRKILETIFTILFAFYLQ.YHTYYLPSA <del>I</del> LMGV <del>A</del> WQQLGWL <del>I</del> HEFAHHOL
<b>egd1</b>	94	GM <del>D</del> ASPLWYSYKIST <del>T</del> LGLGYFLMVQYQMYFICAV <del>V</del> LLGM <del>H</del> YQQMGWL <del>S</del> HDI <del>CH</del> HQT
<b>fat-3</b>	117	GLMKANETY <del>F</del> LEKA <del>I</del> STLSIMAFAYLQ.YLGWYITSAC <del>L</del> LALAWQQEGWL <del>T</del> HEFCH <del>O</del> P
		<u>XXXXHH</u>
<b>fat-4</b>	179	FKNRYYNDIASYFVG <del>N</del> FLOGFSSGGWKEQHN <del>V</del> HAA <del>T</del> NV <del>V</del> GRDG <del>D</del> LDLV <del>P</del> EYATVAEHLN
<b>egd1</b>	154	FKNRNWN <del>N</del> LVGLVFGNGLQGFSVT <del>C</del> WKDRHNAHH <del>S</del> ATNV <del>V</del> Q <del>G</del> H <del>D</del> P <del>I</del> D <del>N</del> L <del>P</del> IAWS <del>E</del> DDV <del>T</del>
<b>fat-3</b>	176	TKNRP <del>L</del> NDTISLFFGNFLQGFSRDWWKDKHNT <del>H</del> AA <del>T</del> NVIDHDGDIDLA <del>P</del> UFAF <del>I</del> PG <del>D</del> L <del>C</del>
		<u>XXXXHH</u>
<b>fat-4</b>	239	NY..SODSWMTLERWQHV <del>H</del> WT <del>F</del> MLP <del>F</del> RL <del>I</del> SW <del>L</del> Q <del>S</del> I <del>I</del> EV <del>S</del> OM <del>P</del> THY <del>Y</del> D <del>Y</del> R <del>N</del> TAI <del>I</del> YEQV
<b>egd1</b>	214	RASPISRK...L <del>I</del> O <del>Q</del> Y <del>Y</del> ELV <del>I</del> C <del>I</del> LLRF <del>I</del> WC <del>F</del> Q <del>V</del> LTVRS <del>I</del> KDRDNOEYR <del>S</del> OYK <del>R</del> EAI
<b>fat-3</b>	236	KYKASEEK <del>A</del> ILKIV <del>P</del> YQHLYFT <del>A</del> MLPM <del>R</del> FSWT <del>G</del> SV <del>O</del> W <del>V</del> EKENQ <del>M</del> BYK <del>V</del> YORNAE <del>W</del> EQ <del>A</del>
<b>fat-4</b>	297	GLSLHWAW.SLGQLYFLPDWSTRIMFFLVSHLVGGFILLSHVVTFNHY <del>S</del> VEKFALSSNIMS
<b>egd1</b>	270	GLALHW <del>T</del> IKALFH <del>L</del> FFMPSII <del>T</del> SL <del>V</del> FEVSELVG <del>G</del> FCIA <del>V</del> V <del>E</del> M <del>N</del> HY <del>P</del> LEK <del>I</del> CDPVWDGH
<b>fat-3</b>	296	TIV <del>E</del> HWAW.VF <del>Y</del> Q <del>L</del> ELLPTW <del>P</del> RVAYFI <del>I</del> ISOM <del>E</del> GG <del>I</del> LIAHVVTFNHNSVD <del>K</del> YPANSRI <del>I</del> N
<b>fat-4</b>	356	NYACLQIMTRNMRPGRFIDWLWGGLNYQIEHHLFPTMPRHNLNTVMPLVKEFAAANGLP
<b>egd1</b>	330	GFSVCQI <del>H</del> ET <del>T</del> NI <del>R</del> RG <del>H</del> ITDWEFGGLNYQIEHHLWPTLPRHNL <del>T</del> AVSYQ <del>E</del> Q <del>I</del> CQK <del>H</del> NLP
<b>fat-3</b>	355	NFAALQILTTRNMRPSPFIDWLWGGLNYQIEHHLFPTMPRCNLNACMKY <del>V</del> KEWCKENNLP
		<u>XXXXHH</u>
<b>fat-4</b>	416	Y <del>M</del> VDDYFTGEW <del>L</del> EIEQERNIANVAAKLT <del>K</del> .KIA
<b>egd1</b>	390	YRNPLP <del>H</del> EGLV <del>I</del> LLRYL <del>A</del> VEARMAEKOPAGK <del>A</del> L
<b>fat-3</b>	415	YLVDDYFDGYAMNLOQLKN <del>M</del> A <del>E</del> ...HIOA.KAA

FIG. 3



**FIG. 4**

20:4 Δ8,11,14,17

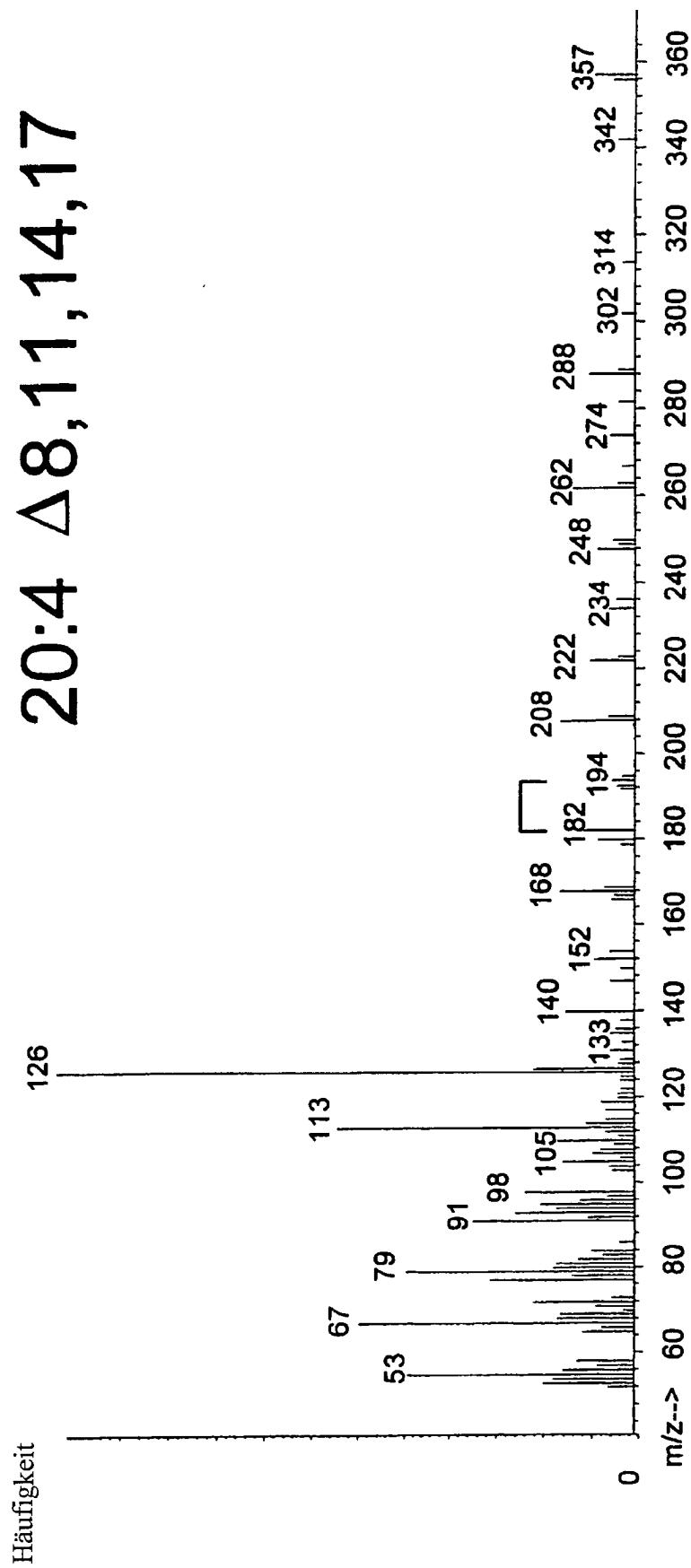


FIG. 5A

20:3 Δ<sup>8,11,14</sup>

Häufigkeit

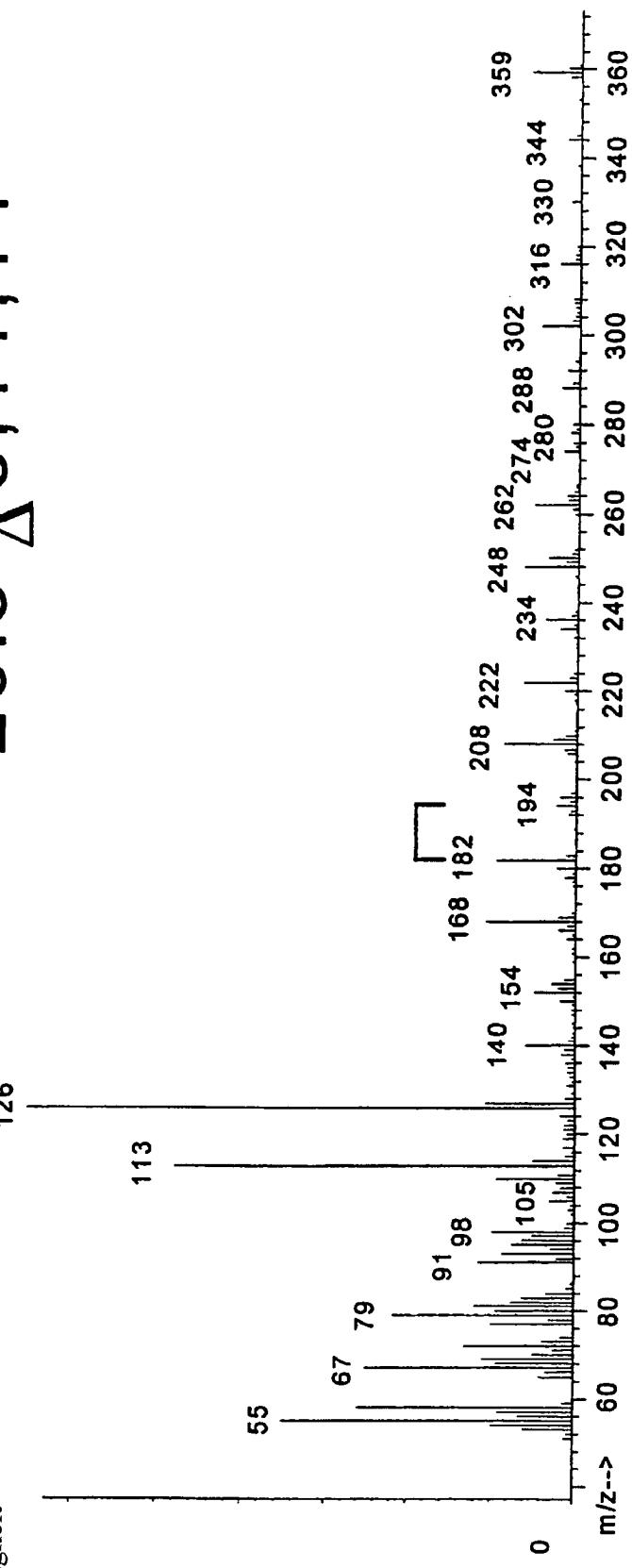


FIG. 5B

20:2  $\Delta$  8,11

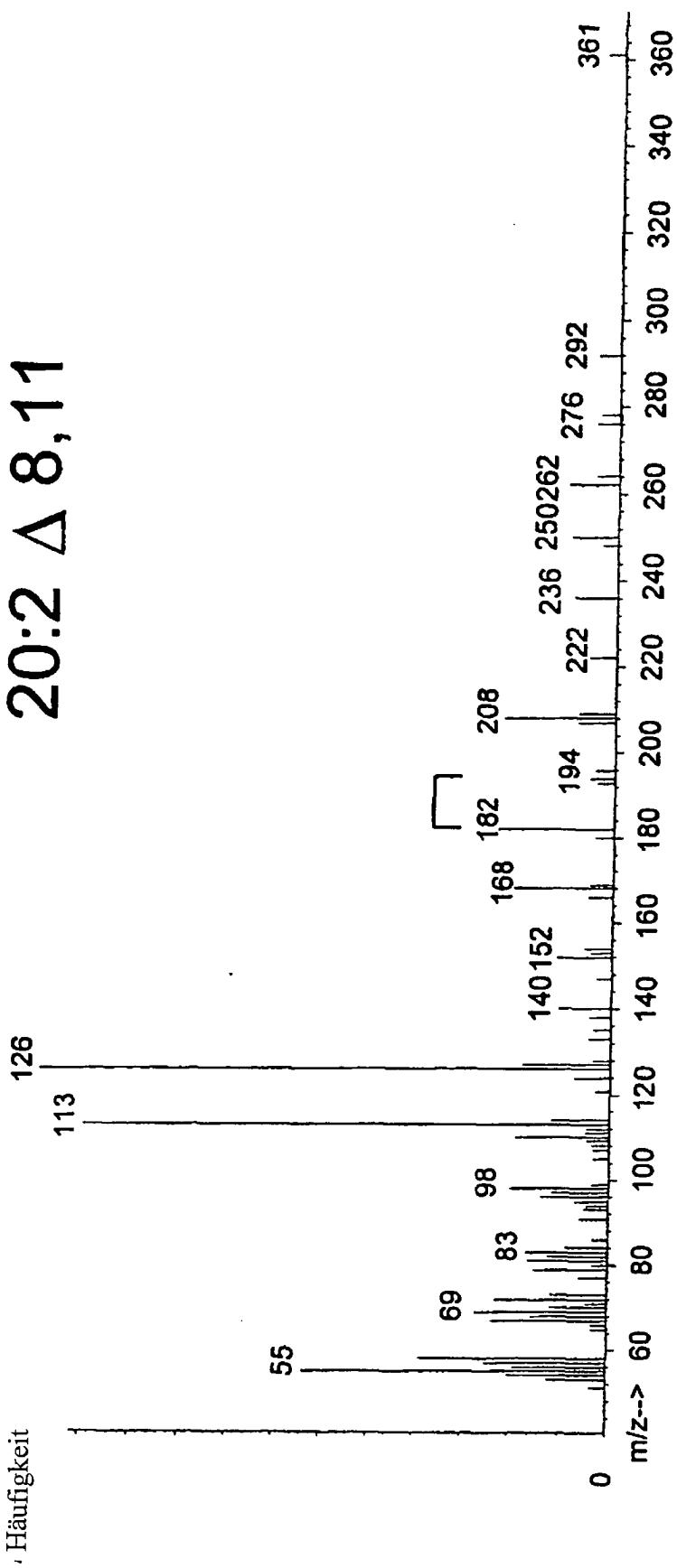


FIG. 5C

1 MVLREQEHEP FFIKIDGKWC QIDDAVLRSH PGGSAITTYK NMDATTVFHT  
51 FHTGSKEAYQ WLTELKKECP TQEPEIPDIK DDPIKGIDDV NMGTFNISEK  
101 RSAQINKSFT DLRMRVRAEG LMDGSPLFYI RKILETIFTI LFAFYLQYHT  
151 YYLPSAILMG VAWQQLGWLI HEFAHHQLFK NRYYNDLASY FVGNFLQGFS  
201 SGGWKEQHNV HHAATNVVGR DGDLDLVPFY ATVAEHLNNY SQDSWVMTLF  
251 RWQHVHWTFM LPFLRLSWLL QSIIFVSQMP THYYDYYRNT AIYEQVGLSL  
301 HWAWSLGQLY FLPDWSTKIM FFLVSHLVGG FLLSHVVTFN HYSVEKFALS  
351 SNIMSNYACL QIMTTRNMRP GRFIDWLWGG LNYQIEHHLF PTMPRHNLNT  
401 VMPLVKEFAA ANGLPYMVDD YFTGFWLEIE QFRNIANVAA KLTKKIA

## FIG. 6A

1 GAATTTCAA TCCTCCTTGG GTCCCACCGC TGTGATATCA AAATGGTATT  
 51 ACGAGAGCAA GAGCATGAGC CATTCTTCAT TAAAATTGAT GGAAAATGGT  
 101 GTCAAATTGA CGATGCTGTC CTGAGATCAC ATCCAGGTGG TAGTGCAATT  
 151 ACTACCTATA AAAATATGGA TGCCACTACC GTATTCCACA CATTCCATAC  
 201 TGGTTCTAAA GAAGCGTATC AATGGCTGAC AGAATTGAAA AAAGAGTGCC  
 251 CTACACAAAGA ACCAGAGATC CCAGATATTA AGGATGACCC AATCAAAGGA  
 301 ATTGATGATG TGAACATGGG AACTTTCAAT ATTTCTGAGA AACGATCTGC  
 351 CCAAATAAAAT AAAAGTTTCA CTGATCTACG TATGCGAGTT CGTGCAGAAG  
 401 GACTTATGGA TGGATCTCCT TTGTTCTACA TTAGAAAAAT TCTTGAAACA  
 451 ATCTTCACAA TTCTTTTGC ATTCTACCTT CAATACCACA CATATTATCT  
 501 TCCATCAGCT ATTCTAATGG GAGTTGCCGTG GCAACAATTG GGATGGTTAA  
 551 TCCATGAATT CGCACATCAT CAGTTGTTCA AAAACAGATA CTACAATGAT  
 601 TTGGCCAGCT ATTTGTTGG AAACTTTTA CAAGGATTCT CATCTGGTGG  
 651 TTGGAAAGAG CAGCACAAATG TGCATCACCG AGCCACAAAT GTTGGTGGAC  
 701 GAGACGGAGA TCTTGATTCA GTCCCATTCT ATGCTACAGT GGCAGAACAT  
 751 CTCAACAATT ATTCTCAGGA TTCATGGGTT ATGACTCTAT TCAGATGGCA  
 801 ACATGTTCAT TGGACATTCA TGTTACCATT CCTCCGTCTC TCGTGGCTTC  
 851 TTCAGTCAAT CATTGGTTT AGTCAGATGC CAACTCATTA TTATGACTAT  
 901 TACAGAAATA CTGCGATTCA TGAACAGGTT GGTCTCTCTT TGCACGGGC  
 951 TTGGTCATTG GGTCAATTGT ATTTCTTACCC CGATTGGTCA ACTAAAATAA  
 1001 TGTTCTTCCT TGTTCTTCAT CTTGTTGGAG GTTTCCTGCT CTCTCATGTA  
 1051 GTTACTTTCA ATCATTATTC AGTGGAGAAG TTTGCATTGA GCTCGAACAT  
 1101 CATGTCAAAT TACGCTTGTC TTCAAATCAT GACCACAAGA AATATGAGAC  
 1151 CTGGAAGATT CATTGACTGG CTTTGGGAG GTCTTAACTA TCAGATTGAG  
 1201 CACCATCTT TCCCAACGAT GCCACGACAC AACTGAAACA CTGTTATGCC  
 1251 ACTTGTAAAG GAGTTGCAG CAGCAAATGG TTTACCATAC ATGGTCGACG  
 1301 ATTATTCAC AGGATTCTGG CTTGAAATTG AGCAATTCCG AAATATTGCA  
 1351 AATGTTGCTG CAAATTGAC TAAAAGATT GCCTAGATTA CGATTAATTA  
 1401 ATCAATTAT TTTCATGTTCA TATTGTTGTG TTTTAATATT TTCCAAATT  
 1451 TTACCTATTC C

**FIG. 6B**

1 MKSKRQALSP LQLMEQTYDV SAWVNFPGG AEIIENYQGR DATDAFMVMH  
51 FQEAFDKLKR MPKINPSFEL PPQAAVNEAQ EDFRKLREEL IATGMFDASP  
101 LWYSYKISTT LGLGVLGYFL MVQYQMYFIG AVLLGMHYQQ MGWLSHDICH  
151 HQTFKNRNWN NLVGLVFGNG LQGFSVTCWK DRHNAHHSAT NVQGHDPDID  
201 NLPPLAWSED DVTRASPISR KLIQFQQYYF LVICILLRFI WCFQCVLTVR  
251 SLKDRDNQFY RSQYKKEAIG LALHWTLKAL FHLFFMPSIL TSLLVFFVSE  
301 LVGGFGIAIV VFMNHYPLEK IGDPVWDGHG FSVGQIHETM NIRRGIIITDW  
351 FFGGLNYQIE HHLWPTLPRH NLTAVSYQVE QLCQKHNLPY RNPLPHEGLV  
401 ILLRYLAVFA RMAEKQPAGEK AL

**FIG. 7A**

1 ATTTTTTTTC GAAATGAAGT CAAAGCGCCA AGCGCTATCC CCCTTACAAT  
 51 TGATGGAACA AACATATGAT GTGGTCAATT TCCACCTCTGG TGGTGCAGAA  
 101 ATTATAGAGA ATTACCAAGG AAGGGATGCC ACTGATGCCT TCATGGTTAT  
 151 GCACCTTCAA GAAGCCTTCG ACAAGCTCAA GCGCATGCC AAAATCAATC  
 201 CCAGTTTGAGT GCCACCC CAGGCTGCAG TGAATGAAGC TCAAGAGGAT  
 251 TTCCGGAAGC TCCGAGAAGA GTTGATCGCA ACTGGCATGT TTGATGCCTC  
 301 CCCCTCTGG TACTCATACA AAATCAGCAC CACACTGGGC CTTGGAGTGC  
 351 TGGGTTATTT CCTGATGGTT CAGTATCAGA TGTATTCAT TGGGGCAGTG  
 401 TTGCTTGGGA TGCACATCA ACAGATGGGC TGGCTTCCTC ATGACATTTG  
 451 CCACCACCAG ACTTTCAAGA ACCGGAACCTG GAACAACCTC GTGGGACTGG  
 501 TATTGGCAA TGGTCTGCAA GGTTTTCCG TGACATGTTG GAAGGACAGA  
 551 CACAATGCAC ATCATTGGC AACCAATGTT CAAGGGCACG ACCCTGATAT  
 601 TGACAACCTC CCCCCCTTAG CCTGGTCTGA GGATGACGTC ACACGGCGT  
 651 CACCGATTTC CCGCAAGCTC ATTCAAGTCC AGCAGTACTA TTTCTTGGTC  
 701 ATCTGTATCT TGTTGCGGTT CATTGGTGT TTCCAGTGC G TGTTGACCGT  
 751 GCGCAGTTG AAGGACAGAG ATAACCAATT CTATCGCTCT CAGTATAAGA  
 801 AGGAGGCCAT TGGCCTCGCC CTGCACTGGA CCTTGAAGGC CCTGTTCCAC  
 851 TTATTCTTA TGCCCAGCAT CCTCACATCG CTGTTGGTGT TTTCTGTTTC  
 901 GGAGCTGGTT GGCGGCTTCG GCATTGCGAT CGTGGTGTTC ATGAACCACT  
 951 ACCCACTGGA GAAGATCGGG GACCCAGTCT GGGATGGCCA TGGATTCTCG  
 1001 GTTGGCCAGA TCCATGAGAC CATGAACATT CGGCGAGGGAA TTATCACAGA  
 1051 TTGGTTTTTC GGAGGCTTGA ATTACCAAGAT TGAGCACCCT TTGTGGCCGA  
 1101 CCCTCCCTCG CCACAACCTG ACAGCGGTTA GCTACCAGGT GGAACAGCTG  
 1151 TGCCAGAACG ACAACCTGCC GTATCGGAAC CCGCTGCCCT ATGAAGGGTT  
 1201 GGTCATCCTG CTGCGCTATC TGGCGGTGTT CGCCCGGATG GCGGAGAACG  
 1251 AACCCGCGGG GAAGGCTCTA TAAGG

**FIG. 7B**

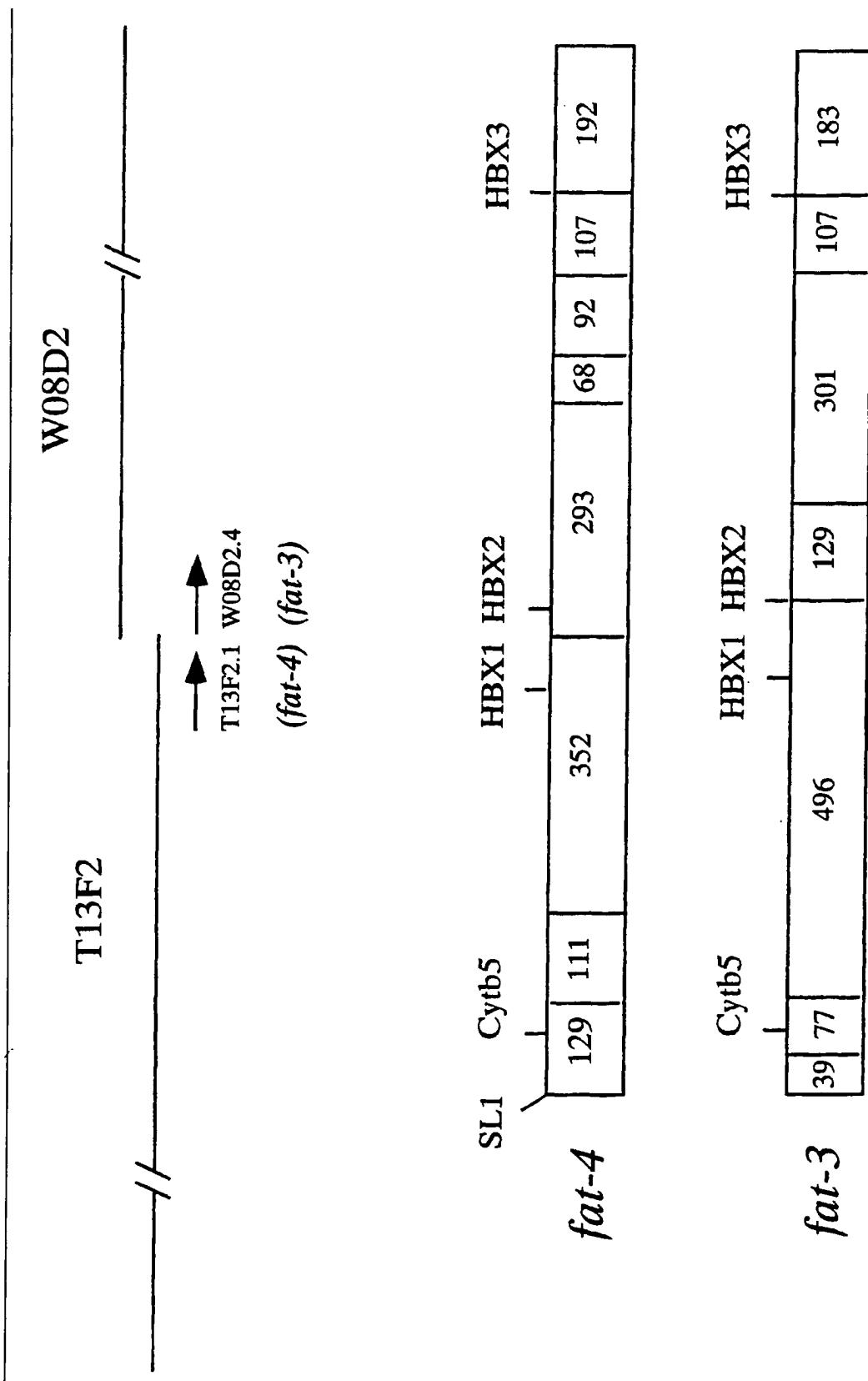


FIG. 8

bord6	1	WHAQIKKYITSDENKNDKGDDWISIOGKAYDVSD.	W KDH PGGS FPKKBLAGOEVYDA	
fat3	1	... . . . . MVV . . . . .	KEH PGGS . VIE QYRNS DATH	
fat4	1	... . . . . MVLRCHEE . . . . .	DAV . . . . . SH PGGS . AIFIYKNMDATIV	
words5	1	MIGTDOGKRTWEIAAHNTKGDFIATGRVYDV.	KFESAHPGGVDTILLGAGRDTVPV	
<hr/>				
bord6	60	FVAFHPAS . . . . .	YRKIVE	
fat3	47	FHAFHGSQAYKOLLDLKKH . . . . .	GEHDEFLEKOLDKRLDKYDINISAMDSVAQEKIVE	
fat4	48	SFTDLREKSKRQYQKCEPQWPEADPKDDP.	DVKIDGKWDODPKGIDDNNGCTSEKRSQONK	
words5	60	FEMXH. . . . .	TLSNSNEPVEPTVHKTTLKTRKEG	
<hr/>				
bord6	99	EFSKMGUYDRKGHMEMTCIAMLFAWYXILFC.	. . . . . YDGLFLWIOSG	
fat3	105	SEKERQYDGLMENKNETEEFKATS.	.. . . . . AAFYLOXYGGWYEETSACL	
fat4	108	SFTDLREKSKRQYQKCEPQWPEADPKDDP.	.. . . . . AWFQEG	
words5	106	YFEDRDPPKNRPETWRYALIFGSYIAKQ.	.. . . . . TLLSNEPVEPTVHKTTLKTRKEG	
<hr/>				
bord6	156	W . . . . .	HHIACNSYEYDPDLO	
fat3	165	W . . . . .	ECGLVHLFSCCLUGFLWIOSG	
fat4	168	W . . . . .	.. . . . . DGDID	
words5	164	LNPNDASHPDVTHNPTWKTEGA.	.. . . . . HHAATNVICDGDID	
<hr/>				
bord6	214	YEPFLUVSSKEEGSITSHEYEXKLEFDSLRSREFSYQHWTETEYFENCAARLNMYYOSLIM.	.. . . . . EYDPLQ	
fat3	223	LAP. . . . .	.. . . . . KFVYPOHAYZETAMLPFLRFSWTGQSQWV	
fat4	226	LAP. . . . .	.. . . . . SODS	
words5	223	TEPDPVRIKRKNOKWFVNHNQDMFVPFLXELAFKVR.	.. . . . . SHLVCCFLSHV	
<hr/>				
bord6	274	LTKRNUVEYAH . . . . .	.. . . . . VQDNENYFVKTNDNIRVN	
fat3	276	FRENOMEYAVYORNA.	ELAGCOPFISIYLLSCLPNFGERKNEVIALSVEGVOOMO.	
fat4	277	SQMPHTYYD.	.. . . . . KFVYPOHAYZETAMLPFLRFSWTGQSQWV	
words5	279	PSTWHTVMEWGGKAFFVYRLLPVQYLPGLKVNILLETVADM.	.. . . . . EFPDFTMNEFHNTMPLRFSWTGQSQWV	
<hr/>				
bord6	327	ESILNHESSSVYVGKPE.	.. . . . . DWEHGGLQ	
fat3	336	VTFNHNSSVYKYPANSKTNNFAALQILTRNMSPPF.	QIEHHLPKMKPR	
fat4	337	VTFNHNSSVYKYPANSKTNNFAALQILTRNMSPPF.	DWLWGLNYQIEHHLPKMKPR	
words5	339	VQX. . . . .	.. . . . . DWLWGLNYQIEHHLPKMKPR	
<hr/>				
bord6	385	CNLRKWSPIVIELCKKHNLPYNYSISISKANEMTTRTIRNTALQARDITKPLPKNLYWEAL	.. . . . .	
fat3	395	CNLNACMXYKVKETCKEENNLPYVDDYEDGYAMNEQOOLNAAE.	.. . . . .	
fat4	396	HNLTWMPPLVKEAANGLPYVDDYETGFWMTEQFRNAAVAAVTTKEA.	.. . . . .	
words5	394	HTPNVS. . . . .	.. . . . . QHHYDDEAIKNTQSSYKVPYLVKDTFWQAFASSHLEFLRVLGIR	
<hr/>				
bord6	445	HTHG		
fat3		.. . .		
fat4				
words5	446	PREE		

FIG. 9

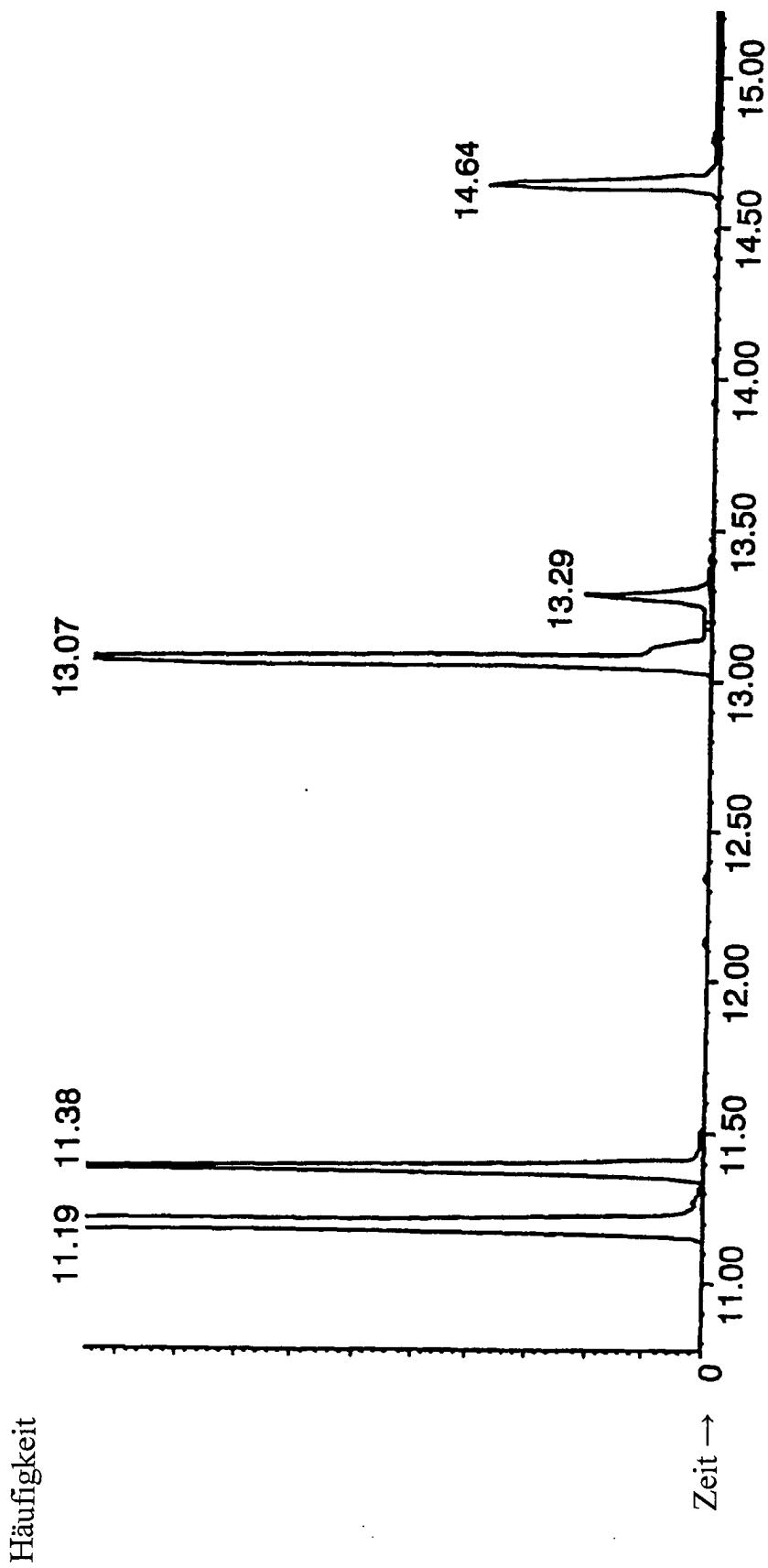


FIG. 10A

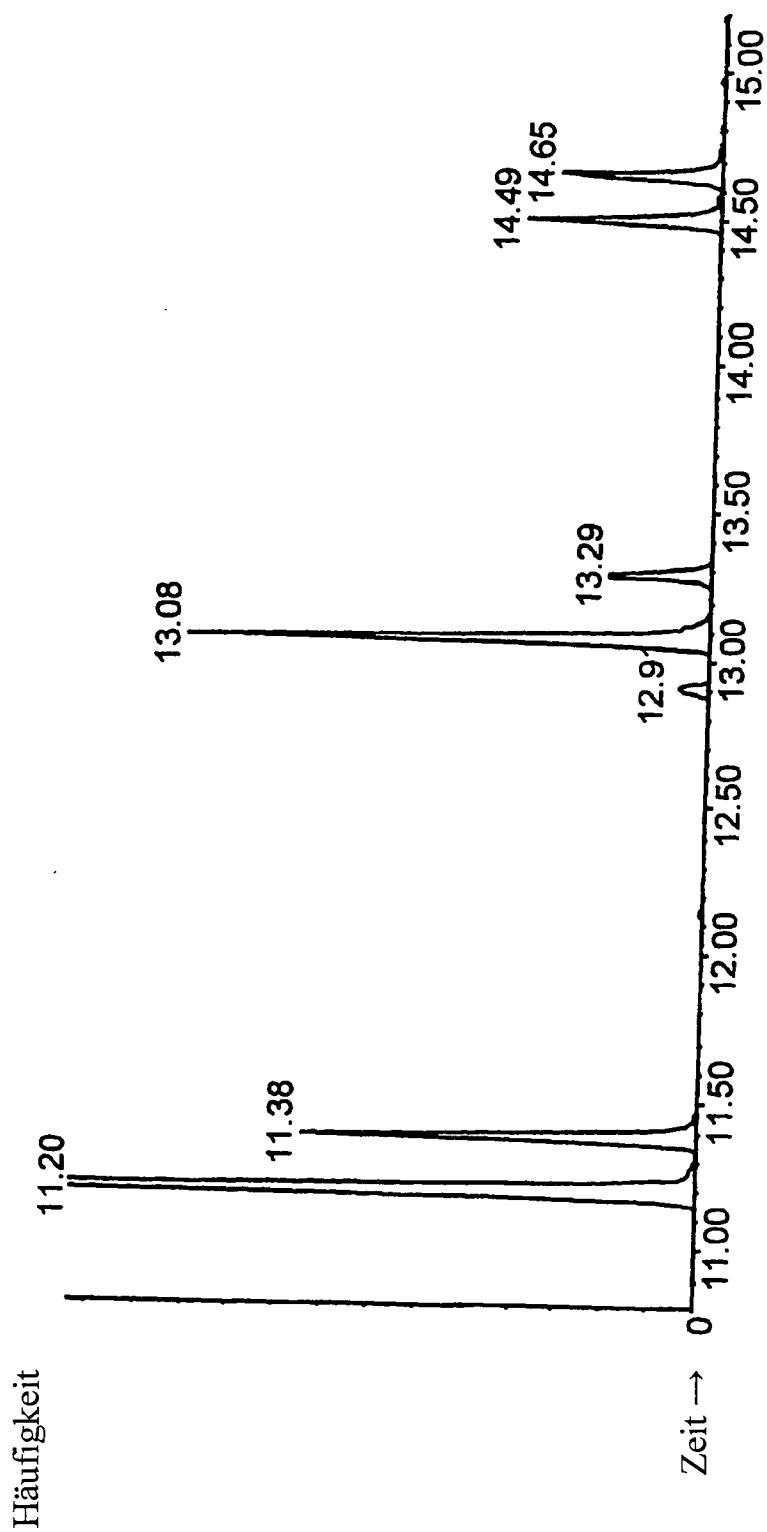


FIG. 10B

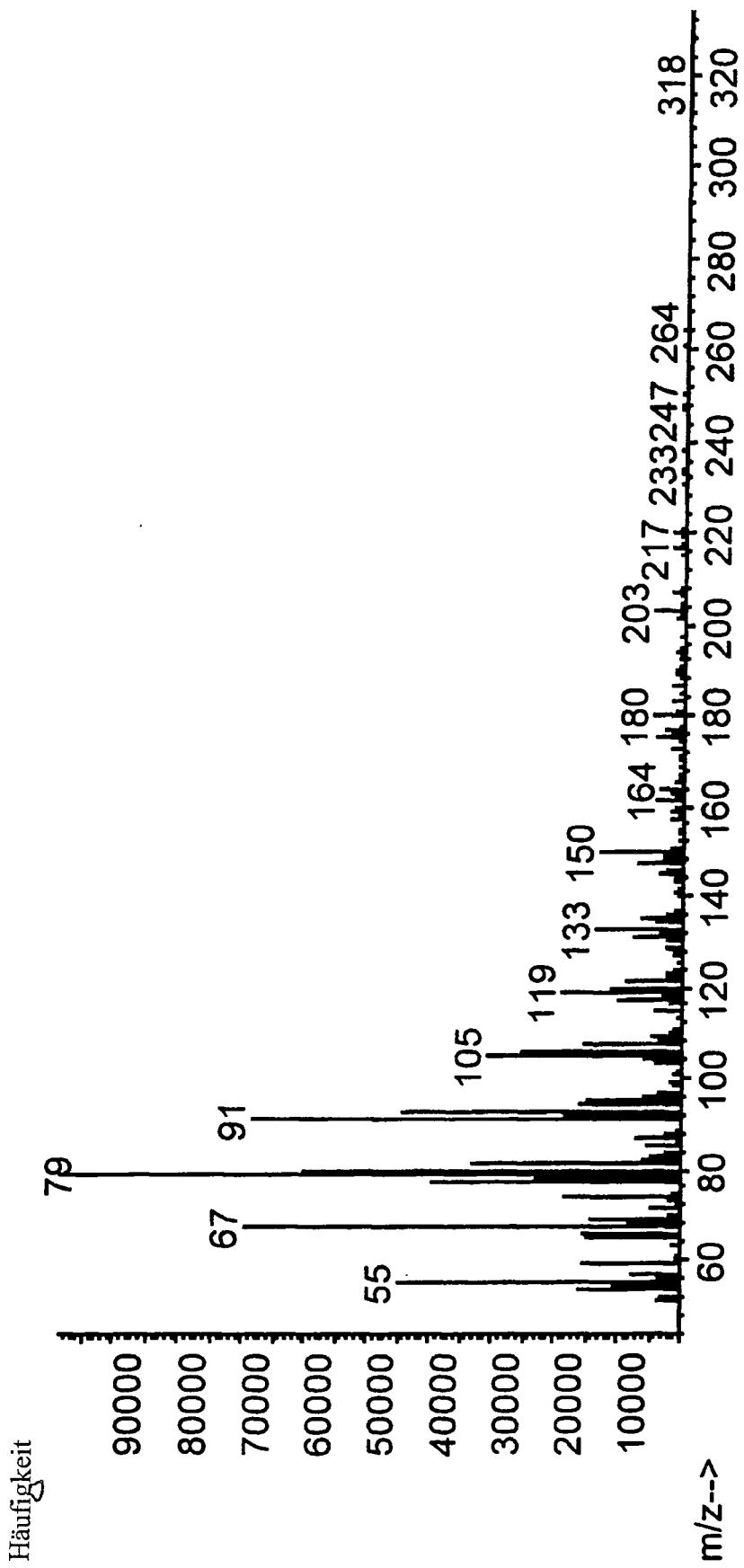
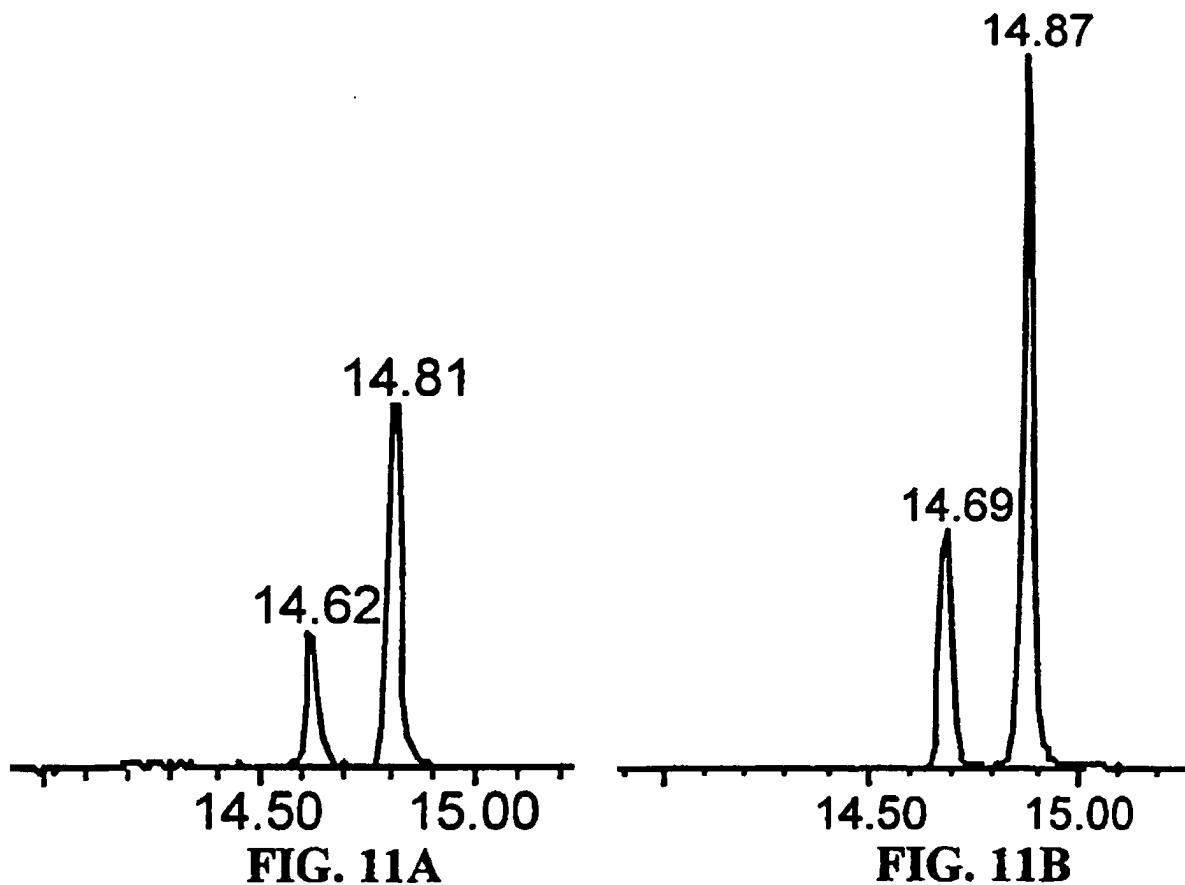


FIG. 10C



FAT-3 ( $\Delta^6$ -Desaturase)		FAT-4 ( $\Delta^5$ -Desaturase)	
Substrat	% konvertiertes Substrat	Substrat	% konvertiertes Substrat
18:1 $\Delta^9$	0	18:1 $\Delta^7$	5
18:2 $\Delta^{9,12}$	14	18:2 $\Delta^{9,12}$	0
18:3 $\Delta^{9,12,15}$	17	18:3 $\Delta^{9,12,15}$	0
20:1 $\Delta^{11}$	0	20:1 $\Delta^{11}$	0
20:2 $\Delta^{11,14}$	0	20:2 $\Delta^{11,14}$	27
20:3 $\Delta^{11,14,17}$	0	20:3 $\Delta^{11,14,17}$	26
20:3 $\Delta^{8,11,14}$	0	20:3 $\Delta^{8,11,14}$	55

**Fig. 12**

	pYES		pYES-541	
	Inkorporierung	Desaturierung	Inkorporierung	Desaturierung
$\Delta^8$ Substrat				
20:3 (11,14,17)	45.9	0	38.4	27.2
20:2 (11,14)	16.7	0	21.3	14.8
20:1 (11)	15.5	0	18.8	6.1
$\Delta^6$ Substrat				
18:3 (9,12,15)	20.9	0	19.2	0
18:2 (9,12)	15.8	0	18.5	0
$\Delta^5$ Substrat				
20:3 (8,11,14)	34.4	0	35.6	0

**FIG. 13**