



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 36 133 T2** 2007.08.16

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 975 765 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 36 133.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/AU98/00246**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 913 438.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/046762**

(86) PCT-Anmeldetag: **09.04.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **22.10.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.02.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **11.10.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.08.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/53** (2006.01)  
**C12N 9/02** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

<b>PO622397</b>	<b>15.04.1997</b>	<b>AU</b>
<b>PO622697</b>	<b>15.04.1997</b>	<b>AU</b>
<b>43706 P</b>	<b>16.04.1997</b>	<b>US</b>
<b>50403 P</b>	<b>20.06.1997</b>	<b>US</b>

(73) Patentinhaber:

**Commonwealth Scientific and Industrial Research  
Organisation, Campbell, AU; BASF Plant Science  
GmbH, 67063 Ludwigshafen, DE**

(74) Vertreter:

**Henkel, Feiler & Hänzel, 80333 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**STYMNE, Sten, S-268 90 Svalov, SE; GREEN,  
Allan, Barton, ACT 2601, AU; SINGH, Surinder,  
Downer, ACT 2602, AU; LENMAN, Marit, S-223 56  
Lund, SE**

(54) Bezeichnung: **PFLANZENGENE, DIE FÜR FETTSÄURENEPOXYGENASE KODIEREN UND IHRE VERWENDUN-  
GEN**

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 eingelegt, 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 vorliegende Erfindung betrifft allgemein neue Gensequenzen, die für Fettsäureepoxygenaseenzyme codieren. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Gensequenzen, die für Fettsäure-p12-Epoxygenaseenzyme, die hierin definiert sind, codieren. Noch spezieller stellt die vorliegende Erfindung cDNA- und genomische Gensequenzen bereit, die für Pflanzenfettsäureepoxygenasen, vorzugsweise p12-Epoxygenasen von *Crepis palaestina* oder *Euphorbia lagascae*, codieren. Die Gensequenzen der vorliegenden Erfindung stellen Mittel bereit, wodurch der Fettsäuremetabolismus in Organismen, wie Hefen, Schimmelpilzen, Bakterien, Insekten, Vögeln, Säugern und Pflanzen, insbesondere unter Umwandlung von ungesättigten Fettsäuren in epoxygenierte Fettsäuren in diesen geändert oder manipuliert werden kann. Die Erfindung erstreckt sich auf genetisch modifizierte ölanreichernde Organismen, die mit den vorliegenden Gensequenzen transformiert sind, und die dadurch abgeleiteten Öle. Die auf diese Weise hergestellten Öle ergeben Mittel für kostengünstige Ausgangsmaterialien zur Verwendung bei der effizienten Produktion von unter anderem Beschichtungen, Harzen, Klebstoffen, Kunststoffen, grenzflächenaktiven Mitteln und Gleitmitteln.

**[0002]** Durchgängig in dieser Beschreibung und den Ansprüchen, die folgen, sollen das Wort "umfassen" oder Variationen wie "umfasst" oder "umfassend", falls es nicht der Zusammenhang anders erfordert, so verstanden werden, dass sie den Einschluss einer angegebenen ganzen Zahl oder Gruppe ganzer Zahlen, jedoch nicht den Ausschluss einer anderen ganzen Zahl oder Gruppe ganzer Zahlen umfassen.

**[0003]** Bibliographische Einzelheiten der Veröffentlichungen, die in dieser Beschreibung durch den Autor angegeben sind, sind am Ende der Beschreibung zusammengefasst. Sequenzidentitätsnummern (SEQ ID NOs) für die in der Beschreibung angegebenen Nucleotid- und Aminosäuresequenzen sind nach der Bibliographie angegeben.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

**[0004]** Weltweit besteht beträchtliches Interesse an der Herstellung chemischer Edukte, wie Fettsäuren, zur großtechnischen Verwendung aus erneuerbaren Pflanzenquellen statt aus nichterneuerbaren Petrochemikalien. Dieses Konzept stellt einen breiten Appell an Hersteller und Verbraucher auf der Basis von Ressourcenerhaltung dar und es ergibt eine signifikante Gelegenheit zur Entwicklung neuer gewerblicher Feldfrüchte für die Landwirtschaft.

**[0005]** Es gibt verschiedene Gruppen ungewöhnlicher Fettsäuren in der Natur und diese sind gut charakterisiert (Badam % Patil, 1981; Smith, 1970). Viele dieser ungewöhnlichen Fettsäuren besitzen gewerbliches Potential und dies führte zu Interesse an der Domestizierung derartiger Arten, um eine landwirtschaftliche Produktion spezieller Fettsäuren zu ermöglichen.

**[0006]** Eine Klasse von Fettsäuren von speziellem Interesse sind die Epoxyfettsäuren, die aus einer Acylkette bestehen, in der zwei aneinandergrenzende Kohlenstoffbindungen durch eine Epoxybrücke verknüpft sind. Aufgrund ihrer hohen Reaktivitäten finden sie beträchtliche Anwendungsmöglichkeiten bei der Herstellung von Beschichtungen, Harzen, Klebstoffen, Kunststoffen, grenzflächenaktiven Stoffen und Gleitmitteln. Diese Fettsäuren werden derzeit durch chemische Epoxydation von Pflanzenölen, hauptsächlich Sojaöl und Leinsamenöl, produziert, jedoch ergibt dieses Verfahren Gemische von mehreren und isomeren Formen und es umfasst bedeutende Verfahrenskosten.

**[0007]** Von anderen wurden Versuche unternommen, Wildpflanzen, die Epoxyfettsäuren enthalten, (beispielsweise *Euphorbia lagascae*, *Vernonia galamensis*) zu kommerziellen Quellen dieser Öle zu entwickeln. Jedoch schränken Probleme mit der agronomischen Eignung und dem Potential einer geringen Ausbeute die kommerzielle Verwendbarkeit von Ansätzen mit traditioneller Pflanzenzucht und Kultivierung stark ein.

**[0008]** Die rasch zunehmende Weiterentwicklung der Gentechnik erleichtert die Effizienz von kommerziell wichtigen gewerblichen Verfahren durch die Expression von Genen, die aus einem ersten Organismus oder einer ersten Art isoliert wurden, in einem zweiten Organismus oder einer zweiten Art, wobei diesem bzw. dieser neue Phänotypen verliehen werden, stark. Insbesondere können herkömmliche gewerbliche Verfahren effizienter oder kostengünstiger gestaltet werden, was zu größeren Ausbeuten pro Kosteneinheit durch die Anwendung gentechnischer Verfahren führt.

**[0009]** Darüber hinaus ergibt die entsprechende Wahl eines Wirtsorganismus zur Expression einer interessierenden Gensequenz die Produktion von Verbindungen, die von dem Wirt normalerweise nicht mit hoher Ausbeute und Reinheit produziert oder synthetisiert werden.

**[0010]** Jedoch bleibt trotz der allgemeinen Wirksamkeit von Gentechnik die Isolierung von Gensequenzen, die für wichtige Enzyme im Fettsäuremetabolismus codieren, insbesondere der Gene, die die Fettsäure-p12-Epoxygenaseenzyme codieren, die unter anderem zur Produktion von 12,13-Epoxy-9-octadecensäure (Vernolsäure) und 12,13-Epoxy-9,15-octadecadiensäure verantwortlich sind, ein Haupthindernis für die Entwicklung von gentechnisch veränderten Organismen, die diese Fettsäuren produzieren.

**[0011]** Bis zur vorliegenden Erfindung gab es nur begrenzte biochemische Daten, die die Natur von Fettsäureepoxygenaseenzymen, insbesondere p12-Epoxygenasen, zeigen. Jedoch scheint in *Euphorbia lagascae* die Bildung von 12,13-Epoxy-9-octadecensäure (Vernolsäure) aus Linolsäure durch ein Cytochrom-P450-abhängiges p12-Epoxygenaseenzym katalysiert zu sein (Bafar et al., 1993; Blee et al., 1994). Ferner besitzen sich entwickelnde Samen von Leinpflanzen die Fähigkeit zur Umwandlung von zugesetzter Vernolsäure in 12,13-Epoxy-9,15-octadecadiensäure durch eine endogene p15-Desaturase (Engeseth und Stymne, 1996). Epoxyfettsäuren können auch durch eine peroxidabhängige Peroxygenase in Pflanzengewebe produziert werden (Blee und Schuber, 1990).

**[0012]** Bei zur vorliegenden Erfindung führenden Arbeiten suchten die Erfinder, Gensequenzen zu isolieren, die für Gene codieren, die zur Produktion von Epoxyfettsäuren, wie 12,13-Epoxy-9-octadecensäure (Vernolsäure) oder 12,13-Epoxy-9,15-octadecadiensäure, wichtig sind, und diese Gensequenzen in hoch produktive kommerzielle Ölpflanzen und/oder andere ölanreichernde Organismen zu übertragen.

#### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0013]** Ein Aspekt der Erfindung stellt ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bereit, das eine Fettsäureepoxygenase codiert oder komplementär zu einem eine Fettsäureepoxygenase codierenden Nucleinsäuremolekül ist.

**[0014]** Ein zweiter Aspekt der Erfindung stellt ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bereit, das unter Bedingungen von mindestens niedriger Stringenz mit mindestens 20 fortlaufenden Nucleotiden von SEQ ID NO: 1 oder 3 oder 5 oder 19 oder 20 oder einer hierzu komplementären Sequenz hybridisiert.

**[0015]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bereit, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die zu mindestens 65 % identisch mit SEQ ID NO: 1 oder 3 oder 5 ist oder zu mindestens 75 % mit mindestens 200 fortlaufenden Nucleotiden in SEQ ID NO: 19 oder 20 oder einer hierzu komplementären Sequenz identisch ist, umfasst.

**[0016]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt ein Genkonstrukt bereit, das das obige isolierte Nucleinsäuremolekül in entweder Sense- oder Antisense-Orientierung in funktioneller Verbindung mit einer Promotorsequenz umfasst.

**[0017]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt ein Verfahren zur Änderung der Konzentrationsmenge von Epoxyfettsäuren in einer Zelle, einem Gewebe, Organ oder Organismus bereit, wobei das Verfahren die Expression eines Sense-, Antisense-, Ribozym- oder Cosuppressionsmoleküls, das das obige isolierte Nucleinsäuremolekül umfasst, in der Zelle über einen Zeitraum und unter Bedingungen, die so ausreichend sind, dass die Konzentrationsmenge von Epoxyfettsäuren darin erhöht oder verringert wird, umfasst.

**[0018]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten, enzymatisch aktiven Epoxygenasepolypeptids in einer Zelle bereit, wobei das Verfahren die Expression des obigen isolierten Nucleinsäuremoleküls in der Zelle über einen Zeitraum und unter Bedingungen, die so ausreichend sind, dass die dadurch codierte Epoxygenase produziert wird, umfasst.

**[0019]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten, enzymatisch aktiven Epoxygenasepolypeptids in einer Zelle bereit, wobei das Verfahren die folgenden Stufen umfasst:

- (i) Produzieren eines Genkonstrukts, das das obige isolierte Nucleinsäuremolekül, das funktional unter die Kontrolle eines Promotors mit der Fähigkeit, die Expression der Gensequenz in der Zelle zu bewirken, und optional eines Expression-Enhancerelements gestellt wurde, umfasst;
- (ii) Transformieren des Genkonstrukts in die Zelle und
- (iii) Selektieren von Transformanten, die eine durch die Gensequenz codierte funktionale Epoxygenase in

hohem Grade exprimieren.

**[0020]** Ein noch weiterer Aspekt der Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten, enzymatisch aktiven Epoxygenasepolypeptids in einer transgenen Pflanze bereit, wobei das Verfahren die folgenden Stufen umfasst:

- (i) Produzieren eines Genkonstrukts, das das obige isolierte Nucleinsäuremolekül, das funktional unter die Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und optional eines Expression-Enhancerelements gestellt wurde, umfasst, wobei die Gensequenzen auch strangaufwärts einer Transkriptionsterminatorsequenz platziert wurden;
- (ii) Transformieren des Genkonstrukts in eine Zelle oder ein Gewebe der Pflanze; und
- (iii) Selektieren von Transformanten, die eine durch die Gensequenz codierte funktionale Epoxygenase in hohem Grade in Samen exprimieren.

**[0021]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt ein rekombinantes Epoxygenasepolypeptid oder funktionales Enzymmolekül bereit.

**[0022]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt eine rekombinante Epoxygenase bereit, die eine Aminosäuresequenz, die in einer der Sequenzen SEQ ID NO: 2 oder 4 oder 6 angegeben ist, oder ein Homologon, Analogon oder Derivat derselben, das zu mindestens etwa 50 % damit identisch ist, umfasst.

**[0023]** Ein noch weiterer Aspekt der Erfindung stellt ein Verfahren zur Produktion einer epoxygenierten Fettsäure in einer Zelle, einem Gewebe, Organ oder Organismus bereit, wobei das Verfahren die Inkubation von einer Zelle, einem Gewebe, Organ oder Organismus, die eine enzymatisch aktive rekombinante Epoxygenase exprimieren, mit einem Fettsäuresubstrat und vorzugsweise einem ungesättigten Fettsäuresubstrat über einen Zeitraum und unter Bedingungen, die so ausreichend sind, dass mindestens eine Kohlenstoffbindung, vorzugsweise eine Kohlenstoffdoppelbindung des Substrats in eine Epoxygruppe umgewandelt wird, umfasst.

**[0024]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt ein immunologisch interaktives Molekül bereit, das an das hierin beschriebene rekombinante Epoxygenasepolypeptid oder ein Homologon, Analogon oder Derivat desselben bindet.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0025]** [Fig. 1](#) ist eine lineare Darstellung eines Expressionsplasmids, das ein Epoxygenasestrukturgen, das funktional unter die Kontrolle des verkürzten Napin-Promotors (FP1, rechter schraffierter Kasten) gestellt und strangaufwärts der NOS-Terminatorsequenz (rechter gepunkteter Kasten) platziert ist, umfasst. Die Epoxygenasegensequenz wird durch den rechten leeren rechteckigen Kasten angegeben. Das Konstrukt umfasst auch den NOS-Promotor (linker schraffierter Kasten), der die Expression des NPTII-Gens (linker leerer Kasten) antreibt und strangaufwärts des NOS-Terminators (linker gepunkteter Kasten) platziert ist. Die linken und rechten Randsequenzen des Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* sind ebenfalls angegeben.

**[0026]** [Fig. 2](#) ist eine schematische Darstellung, die das Alignment der Aminosäuresequenzen des Epoxygenasepolypeptids von *Crepis palaestina* (Cpal2, SEQ ID NO: 2), einer weiteren Epoxygenase, die von einer anderen *Crepis* sp. als *C. palaestina* stammt, die hohe Konzentrationsmengen von Vernolsäure produziert (CrepX, SEQ ID NO: 4), einer partiellen Aminosäuresequenz eines Epoxygenasepolypeptids, das von *Vernonia galamensis* stammt (Vgal1, SEQ ID NO: 6), der Aminosäuresequenz der p12-Acetylenase von *Crepis alpina* (Crep1, SEQ ID NO: 8), der p12-Desaturasen von *A. thaliana* (L26296, SEQ ID NO: 9), *Brassica juncea* (X91139, SEQ ID NO: 10), *Glycine max* (L43921, SEQ ID NO: 11), *Solanum commersonii* (X92847, SEQ ID NO: 12) und *Glycine max* (L43920, SEQ ID NO: 13) und der p12-Hydroxylase von *Ricinus communis* (U22378, SEQ ID NO: 14) zeigt. Unterstrichen sind drei histidinreiche Motive, die in nicht-hämhaltigen Monooxygenasen gemischter Funktion konserviert sind.

**[0027]** [Fig. 3](#) ist eine Kopie einer photographischen Darstellung einer Northern-Blot-Hybridisierung, die die samenspezifische Expression des Epoxygenasegens von *Crepis palaestina* am Beispiel von SEQ ID NO: 1 zeigt. Northern-Blot-Analyse von Gesamt-RNA von Blättern (Bahn 1) und sich entwickelnden Samen (Bahn 2) von *Crepis palaestina*. 15 µg Gesamt-RNA wurde auf einem Northern-Gel laufen gelassen und auf Hybond N<sup>+</sup>-Membran von Amersham nach den Vorschriften des Herstellers geblottet. Der Blot wurde bei 60 °C mit einer Sonde, die aus der 3'-nichttranslatierten Region von SEQ ID NO: 1 hergestellt wurde, hybridisiert. Der Blot wurde zweimal in 2 × SSC (NaCl-Natriumcitratpuffer) bei Raumtemperatur während 10 min und dann in 0,1 × SSC bei 60 °C während 20 min gewaschen.

**[0028]** [Fig. 4](#) ist eine schematische Darstellung, die die Nucleotidsequenz des entarteten PCR-Primers (5' → 3'-Richtung) der zur Isolierung der Epoxygenasegene von *Euphorbia lagascae*, die hierin beschrieben sind, verwendet wurde, zeigt.

**[0029]** [Fig. 5](#) ist eine Kopie einer photographischen Darstellung einer RNA-Dot-Blot-Hybridisierung, die die Expression des Epoxygenasegens, das als Beispiel in SEQ ID NO: 3 angegeben ist, in Pflanzen, die Vernolsäure produzieren, im Vergleich zu Pflanzen, die keine Vernolsäure produzieren, zeigt. 1 µg Gesamt-RNA wurde aus dem spezifizierten Gewebe isoliert und durch Dot-Blot auf die Hybond N<sup>+</sup>-Membran von Amersham nach den Vorschriften des Herstellers übertragen. Der Blot wurde bei 42 °C in 50 %-igem Formamid mit der relevanten, <sup>32</sup>P-markierten Sonde, die von SEQ ID NO: 3 hergestellt wurde, 16 h hybridisiert. Die Blots wurden zweimal in 2 × SSC (NaCl-Natriumcitratpuffer) bei Raumtemperatur und dann in 0,5 × SSC bei 55 °C während 20 min gewaschen. Autoradiographien wurden nach Exposition über Nacht erhalten. Panel A zeigt die Gesamt-RNA von sich entwickelnden Samen von *Euphorbia lagascae* (1), *Euphorbia cyparissus* (2), *Vernonia galamensis* (3) und Flachs (*Linum usitatissimum*) (4). Panel B zeigt die Gesamt-RNA von verschiedenen Geweben von *Euphorbia lagascae*, die sich entwickelnden Samen (1), Wurzeln (2) und Blätter (3) umfassen.

**[0030]** [Fig. 6](#) ist eine schematische Darstellung, die das subtraktive Hybridisierungsverfahren zeigt, das zur Isolierung der hierin beschriebenen Epoxygenasegene von *Euphorbia lagascae* verwendet wurde. Der +6cDNA-Pool bestand überwiegend aus samenspeicherungsproteinähnlichen Sequenzen. Ein Pool von 15 derartigen Sequenzen wurde biotinyliert und des weiteren von der +6cDNA subtrahiert. LH = lange Hybridisierung – 20 h; SH = kurze Hybridisierung – 3 h.

**[0031]** [Fig. 7](#) ist eine Kopie einer photographischen Darstellung einer RNA-Dot-Blot-Hybridisierung, die die Expression des Epoxygenasegens, das als Beispiel in SEQ ID NO: 20 angegeben ist, in Pflanzen, die Vernolsäure produzieren, im Vergleich zu Pflanzen, die keine Vernolsäure produzieren, zeigt. 1 µg Gesamt-RNA wurde aus dem spezifizierten Gewebe isoliert und durch Dot-Blot auf die Hybond N<sup>+</sup>-Membran von Amersham nach den Vorschriften des Herstellers übertragen. Der Blot wurde bei 42 °C in 50 %-igem Formamid mit der relevanten, <sup>32</sup>P-markierten Sonde, die von SEQ ID NO: 20 hergestellt wurde, 16 h hybridisiert. Die Blots wurden zweimal in 2 × SSC (NaCl-Natriumcitratpuffer) bei Raumtemperatur und dann in 0,5 × SSC bei 55 °C während 20 min gewaschen. Autoradiographien wurden nach Exposition über Nacht erhalten. Panel A zeigt die Gesamt-RNA von sich entwickelnden Samen von *Euphorbia lagascae* (1), *Euphorbia cyparissus* (2), *Vernonia galamensis* (3) und Flachs (*Linum usitatissimum*) (4). Panel B zeigt die Gesamt-RNA von verschiedenen Geweben von *Euphorbia lagascae*, die sich entwickelnden Samen (1), Wurzeln (2) und Blätter (3) umfassen.

**[0032]** [Fig. 8](#) ist eine schematische Darstellung eines binären Plasmidvektors, der eine Expressionskassette enthält, die den gekürzten samenspezifischen Napin-Promotor (Napin) und Nopalinsyntheseterminator (NT) mit einer dazwischenliegenden BamHI-Klonierungsstelle zusätzlich zu dem Kanamycin-Resistenzgen NPTII in funktioneller Verknüpfung mit den Nopalinsynthesepromotor(NP)- und Nopalinsyntheseterminator(NT)sequenzen umfasst. Die Expressionskassette wird von T-DNA-Linksrand(LB)- und -Rechtsrand(RB)sequenzen flankiert.

**[0033]** [Fig. 9](#) ist eine schematische Darstellung eines binären Plasmidvektors, der eine Expressionskassette enthält, die SEQ ID NO: 1, das funktional unter die Kontrolle eines gekürzten samenspezifischen Napin-Promotors (Napin) gestellt und strangaufwärts des Nopalinsyntheseterminators (NT) platziert wurde, zusätzlich zu dem Kanamycin-Resistenzgen NPTII, das funktional mit den Nopalinsynthesepromotor(NP)- und Nopalinsyntheseterminator(NT)sequenzen verbunden ist, umfasst. Die Expressionskassette ist von T-DNA-Linksrand(LB)- und -Rechtsrand(RB)sequenzen flankiert. Zur Herstellung dieses Konstrukts wird SEQ ID NO: 1 in die BamHI-Stelle des in [Fig. 8](#) angegebenen binären Vektors inseriert.

**[0034]** [Fig. 10](#) ist eine graphische Darstellung der Gaschromatographieregistrierkurven von Fettsäuremethylestern, die aus Ölsamen von nichttransformierten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen [Panel (a)] oder *A. thaliana*-Pflanzen (transgene Linie Cpal-17), die mit SEQ ID NO: 1 unter Verwendung des in [Fig. 9](#) angegebenen Genkonstrukts transformiert wurden, [Panel (b) und (c)] hergestellt wurden. In Panel (a) und (b) wurden Fettsäuremethylester unter Verwendung einer Trennung einer gepackten Säule getrennt. In Panel (c) wurden die Fettsäuremethylester unter Verwendung von Kapillarsäulentrennung getrennt. Die Elutionspositionen von Vernolsäure sind angegeben.

**[0035]** [Fig. 11](#) ist eine graphische Darstellung, die die gemeinsame Verteilung von Epoxyfettsäuren in selbständig erhaltenen Samen an T<sub>1</sub>-Pflanzen von Cpal2-transformierten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, die unter

Verwendung von Gaschromatographie bestimmt wurde, zeigt. Die Konzentrationsmengen von sowohl Vernolsäure (x-Achse) als auch 12,13-Epoxy-9-octadecadiensäure (y-Achse) wurden bestimmt und relativ zueinander aufgetragen. Die Daten zeigen eine positive Korrelation zwischen den Konzentrationsmengen dieser Fettsäuren in transgenen Pflanzen.

**[0036]** [Fig. 12](#) ist eine graphische Darstellung, die den Einbau einer  $^{14}\text{C}$ -Markierung in die Chloroformphase, die durch Lipidextraktion von Leinsamenkotyledonen während einer Zufuhr von markiertem Substrat erhalten wurde, zeigt. Verwendete Symbole: ♦ Zufuhr von  $^{14}\text{C}$ Ölsäure, ■ Zufuhr von  $^{14}\text{C}$ Vernolsäure.

**[0037]** [Fig. 13](#) ist eine graphische Darstellung, die den Einbau der  $^{14}\text{C}$ -Markierung in das Phosphatidylcholin von Leinsamenkotyledonen während einer Zufuhr von markiertem Substrat zeigt. Verwendete Symbole: ♦ Zufuhr von  $^{14}\text{C}$ Ölsäure, ■ Zufuhr von  $^{14}\text{C}$ Vernolsäure.

**[0038]** [Fig. 14](#) ist eine graphische Darstellung, die den Einbau der  $^{14}\text{C}$ -Markierung in die Triacylglycerine von Leinsamenkotyledonen während einer Zufuhr von markiertem Substrat zeigt. Verwendete Symbole: ♦ Zufuhr von  $^{14}\text{C}$ Ölsäure, ■ Zufuhr von  $^{14}\text{C}$ Vernolsäure.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

**[0039]** Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bereit, das für eine Fettsäureepoxygenase codiert oder komplementär zu einem eine Fettsäureepoxygenase codierenden isolierten Nucleinsäuremolekül ist.

**[0040]** Wenn das isolierte Nucleinsäuremolekül der Erfindung für ein Enzym codiert, das an der direkten Epoxidation von Arachidonsäure beteiligt ist, ist es besonders bevorzugt, wenn das betreffende Nucleinsäuremolekül von einer Nichtsäugerquelle stammt.

**[0041]** Der hier verwendete Ausdruck "stammt von" soll so verstanden werden, dass er angibt, dass eine spezielle Einheit oder eine Gruppe von Einheiten von der angegebenen Spezies stammt, jedoch nicht zwangsläufig direkt von der angegebenen Quelle erhalten wurde.

**[0042]** Der Ausdruck "Nichtsäugerquelle" bezeichnet einen beliebigen anderen Organismus als einen Säuger oder ein Gewebe oder eine Zelle, die von diesen abgeleitet sind.

**[0043]** Im vorliegenden Zusammenhang soll der Ausdruck "von einer Nichtsäugerquelle stammend" so verstanden werden, dass er anzeigt, dass eine spezielle Einheit oder Gruppe von Einheiten von Bakterien, Hefen, Vögeln, Amphibien, Reptilien, Insekten, Pflanzen, Pilzen, Schimmelpilzen und Algen oder anderen Nichtsäugern stammt.

**[0044]** In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Quellorganismus ein beliebiger Organismus, der die genetisch bedingte Fähigkeit zur Synthese von Epoxyfettsäuren besitzt. Noch besser ist der Quellorganismus eine Pflanze, beispielsweise unter anderem, ohne hierauf beschränkt zu sein, *Chrysanthemum* spp., *Crepis* spp., *Euphorbia* spp. und *Vernonia* spp..

**[0045]** Noch besser ist der Quellorganismus aus der Liste von *Crepis biennis*, *Crepis aurea*, *Crepis conyzifolia*, *Crepis intermedia*, *Crepis occidentalis*, *Crepis palaestina*, *Crepis vesicaria*, *Crepis xanthanthra*, *Euphorbia lagascae* und *Vernonia galamensis* ausgewählt. Weitere Arten sind nicht ausgeschlossen.

**[0046]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Quellorganismus unter anderem eine *Crepis* sp., die hohe Konzentrationsmengen Vernolsäure enthält, wie *Crepis palaestina*, oder alternativ *Vernonia galamensis* oder *Euphorbia lagascae*.

**[0047]** Wenn das isolierte Nucleinsäuremolekül der Erfindung für ein p6-Epoxygenase- oder p9-Epoxygenaseenzym oder p12-Epoxygenase- oder p15-Epoxygenaseenzym codiert oder mindestens für ein Enzym codiert, das nicht an der direkten Epoxidation von Arachidonsäure beteiligt ist, kann das vorliegende Nucleinsäuremolekül aus einer beliebigen, das Enzym produzierenden Quelle stammen, wobei diese, ohne hierauf beschränkt zu sein, Hefen, Schimmelpilze, Bakterien, Insekten, Vögel, Säuger und Pflanzen umfasst.

**[0048]** Das Nucleinsäuremolekül der Erfindung gemäß einer der vorhergehenden Ausführungsformen kann DNA, beispielsweise ein Gen, ein cDNA-Molekül, RNA-Molekül oder ein synthetisches Oligonucleotidmolekül,

entweder ein einzelsträngiges oder doppelsträngiges und ungeachtet von Sekundärstruktureigenschaften, falls nicht speziell angegeben, sein.

**[0049]** Ein Verweis hierin auf ein "Gen" soll in dessen breitem Zusammenhang genommen werden und er umfasst:

- (i) ein klassisches genomisches Gen, das aus für die Transkription und/oder Translation regulatorischen Sequenzen und/oder einer codierenden Region und/oder nichttranslatierten Sequenzen (d.h. Introns, 5'- und 3'-nichttranslatierten Sequenzen) besteht; oder
- (ii) mRNA oder cDNA, die den codierenden Regionen (d.h. Exons) und 5'- und 3'-nichttranslatierten Sequenzen des Gens entspricht.

**[0050]** Der Ausdruck "Gen" wird auch zur Beschreibung von synthetischen oder Fusionsmolekülen, die das gesamte funktionale Produkt oder einen Teil eines funktionalen Produkts codieren, verwendet. Bevorzugte Epoxygenasegene der vorliegenden Erfindung können von einem natürlich vorkommenden Epoxygenasegen durch gentechnische Standardverfahren abgeleitet werden. Allgemein kann ein Epoxygenasegen einer Mutagenese zur Bildung von Einzel- oder Mehrfachnucleotidsubstitutionen, -deletionen und/oder -additionen unterzogen werden.

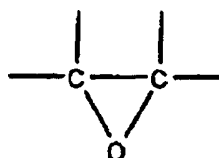
**[0051]** Nucleotidinsertionsderivate umfassen 5'- und 3'-terminale Fusionen sowie Intrasequenzinsertionen von einzelnen oder mehreren Nucleotiden. Insertionsnucleotidsequenzvarianten sind diejenigen, in die ein oder mehrere Nucleotide in eine vorgegebene Stelle in der Nucleotidsequenz eingeführt sind, obwohl eine willkürliche Insertion mit einem geeigneten Screening des gebildeten Produkts auch möglich ist.

**[0052]** Deletionsvarianten sind durch die Entfernung von einem oder mehreren Nucleotiden aus der Sequenz gekennzeichnet.

**[0053]** Substitutionsnucleotidvarianten sind diejenigen, in denen mindestens ein Nucleotid in der Sequenz entfernt wurde und ein unterschiedliches Nucleotid an dessen Stelle inseriert ist. Eine derartige Substitution kann "stumm" insofern sein, als die Substitution die durch den Codon festgelegte Aminosäure nicht ändert. Alternativ werden Substitutionen so gestaltet, dass eine Aminosäure durch eine andere, ähnlich wirkende Aminosäure oder eine Aminosäure ähnlicher Ladung, Polarität oder Hydrophobie ausgetauscht wird.

**[0054]** Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung soll der Ausdruck "Fettsäureepoxygenase" so verstanden werden, dass er ein beliebiges Enzym oder ein funktional äquivalentes oder enzymatisch aktives Derivat desselben, das die Biosynthese einer epoxygenierten Fettsäure durch Umwandlung einer Kohlenstoffbindung einer Fettsäure in eine Epoxygruppe und vorzugsweise durch Umwandlung einer Kohlenstoffdoppelbindung einer ungesättigten Fettsäure in eine Epoxygruppe katalysiert, bezeichnet. Obwohl dies die Erfindung nicht beschränken soll, kann eine Fettsäureepoxygenase die Biosynthese einer Epoxyfettsäure, die aus der Liste ausgewählt ist, die unter anderem 12,13-Epoxy-9-octadecensäure (Vernolsäure), 12,13-Epoxy-9,15-octadecadiensäure, 15,16-Epoxy-9,12-octadecadiensäure, 9,10-Epoxy-12-octadecensäure und 9,10-Epoxy-octadecensäure umfasst, katalysieren.

**[0055]** Der Ausdruck "Epoxy", "Epoxygruppe" und "Epoxyrest" bezeichnet, was dem Fachmann bekannt ist, einen dreigliedrigen Ring, der zwei Kohlenstoffatome und ein Sauerstoffatom durch Einfachbindungen wie im folgenden angegeben verknüpft, umfasst:



**[0056]** Entsprechend bezeichnet der Ausdruck "Epoxid" Verbindungen, die mindestens eine Epoxygruppe, wie im vorhergehenden definiert, umfassen.

**[0057]** Dem Fachmann ist klar, dass die Fettsäurenomenklatur auf der Länge der Kohlenstoffkette und der Position ungesättigter Kohlenstoffatome in der Kohlenstoffkette basiert. Daher werden Fettsäuren unter Verwendung der Kurzbezeichnung:

Kohlenstoff<sub>insgesamt</sub>:Doppelbindung<sub>insgesamt</sub><sup>Doppelbindungs(p)position</sup>



bezeichnet, wobei die Doppelbindungen, falls nicht anders angegeben, cis sind. Beispielsweise ist Palmitinsäure (n-Hexadecansäure) eine gesättigte 16-Kohlenstoff-Fettsäure (d.h. 16:0), Ölsäure (Octadecensäure) eine ungesättigte 18-Kohlenstoff-Fettsäure mit einer Doppelbindung zwischen C-9 und C-10 (d.h. 18:1<sup>p9</sup>) und Linolsäure (Octadecadiensäure) eine ungesättigte 18-Kohlenstoff-Fettsäure mit zwei Doppelbindungen zwischen C-9 und C-10 und zwischen C-12 und C-13 (d.h. 18:2<sup>p9,12</sup>).

**[0058]** Jedoch kann im vorliegenden Zusammenhang ein Epoxygenaseenzym die Umwandlung einer beliebigen Kohlenstoffbindung in eine Epoxygruppe oder alternativ die Umwandlung einer beliebigen Doppelbindung in einem ungesättigten Fettsäuresubstrat in eine Epoxygruppe katalysieren. Im Hinblick darauf ist es dem Fachmann geläufig, dass die meisten einfach ungesättigten Fettsäuren höherer Organismen ungesättigte 18-Kohlenstoff-Fettsäuren (d.h. 18:1<sup>p9</sup>) sind, während die meisten mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die von höheren Organismen stammen, 18-Kohlenstoff-Fettsäuren sind, wobei mindestens eine der Doppelbindungen in diesen zwischen C-9 und C-10 positioniert ist. Ferner besitzen Bakterien ebenfalls einfach ungesättigte C16-Fettsäuren. Darüber hinaus kann die Epoxygenase der vorliegenden Erfindung auf mehr als ein einziges Fettsäuresubstratmolekül wirken und infolgedessen ist die vorliegende Erfindung nicht durch die Natur des Substratmoleküls, auf das das vorliegende Epoxygenaseenzym wirkt, beschränkt.

**[0059]** Vorzugsweise ist das Substratmolekül für die Epoxygenase der vorliegenden Erfindung eine ungesättigte Fettsäure, die mindestens eine Doppelbindung enthält.

**[0060]** Ferner können Epoxygenaseenzyme auf eine beliebige Zahl von Kohlenstoffatomen in einem beliebigen Substratmolekül wirken. Beispielsweise können sie unter anderem als p6-Epoxygenase-, p9-Epoxygenase-, p12-Epoxygenase- oder p15-Epoxygenaseenzyme gekennzeichnet werden. Entsprechend ist die vorliegende Erfindung nicht durch die Position des Kohlenstoffatoms in dem Substrat, auf das ein Epoxygenaseenzym wirken kann, beschränkt.

**[0061]** Der hier verwendete Ausdruck "p6-Epoxygenase" soll ein Epoxygenaseenzym bezeichnen, das die Umwandlung der p6-Kohlenstoffbindung eines Fettsäuresubstrats in eine p6-Epoxygruppe katalysiert und vorzugsweise die Umwandlung der p6-Doppelbindung von mindestens einer ungesättigten Fettsäure in eine p6-Epoxygruppe katalysiert.

**[0062]** Der hier verwendete Ausdruck "p9-Epoxygenase" soll ein Epoxygenaseenzym bezeichnen, das die Umwandlung der p9-Kohlenstoffbindung eines Fettsäuresubstrats in eine p9-Epoxygruppe katalysiert und vorzugsweise die Umwandlung der p9-Doppelbindung von mindestens einer ungesättigten Fettsäure in eine p9-Epoxygruppe katalysiert.

**[0063]** Der hier verwendete Ausdruck "p12-Epoxygenase" soll ein Epoxygenaseenzym bezeichnen, das die Umwandlung der p12-Kohlenstoffbindung eines Fettsäuresubstrats in eine p12-Epoxygruppe katalysiert und vorzugsweise die Umwandlung der p12-Doppelbindung von mindestens einer ungesättigten Fettsäure in eine p12-Epoxygruppe katalysiert.

**[0064]** Der hier verwendete Ausdruck "p15-Epoxygenase" soll ein Epoxygenaseenzym bezeichnen, das die Umwandlung der p15-Kohlenstoffbindung eines Fettsäuresubstrats in eine p15-Epoxygruppe katalysiert und vorzugsweise die Umwandlung der p15-Doppelbindung von mindestens einer ungesättigten Fettsäure in eine p15-Epoxygruppe katalysiert.

**[0065]** Die vorliegende Erfindung erstreckt sich klar auf Gensequenzen, die für alle der oben aufgelisteten Epoxygenaseenzyme unter anderen codieren.

**[0066]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung codiert das isolierte Nucleinsäuremolekül für ein Fettsäureepoxygenaseenzym, das mindestens eine Kohlenstoffbindung in Palmitoleinsäure (16:1<sup>p9</sup>), Ölsäure (18:1<sup>p9</sup>), Linolsäure (18:2<sup>p9,12</sup>), Linolensäure (18:3<sup>p9,12,15</sup>) oder Arachidonsäure (20:4<sup>p5,8,11,14</sup>) in eine Epoxyverbindung umwandelt. Vorzugsweise ist die Kohlenstoffbindung eine Kohlenstoffdoppelbindung.

**[0067]** Noch besser codiert das isolierte Nucleinsäuremolekül der Erfindung für ein Fettsäureepoxygenaseenzym, das mindestens eine oder beide Doppelbindungen in Linolsäure in eine Epoxygruppe umwandelt. Gemäß dieser Ausführungsform kann eine Epoxygenase, die sowohl die p9- als auch die p12-Doppelbindung von Linolsäure in eine Epoxygruppe umwandelt, diese Umwandlungen unabhängig voneinander derart, dass die Epoxygenase ein p9-Epoxygenase- und/oder p12-Epoxygenaseenzym, das hierin zuvor definiert wurde, ist, katalysieren.



**[0068]** In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform ist die Fettsäureepoxygenase der vorliegenden Erfindung eine p12-Epoxygenase, p15-Epoxygenase oder p9-Epoxygenase, die hierin zuvor definiert ist.

**[0069]** Noch besser ist die Fettsäureepoxygenase der Erfindung eine p12-Epoxygenase, die hierin zuvor definiert ist.

**[0070]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Bereitstellung eines isolierten Nucleinsäuremoleküls, das für Linoleat-p12-Epoxygenase codiert, ein Enzym, das mindestens die p12-Doppelbindung von Linolsäure in eine p12-Epoxygruppe umwandelt, wodurch 12,13-Epoxy-9-octadecensäure (Vernolsäure) produziert wird.

**[0071]** Ohne die vorliegende Erfindung einzuschränken, ist die bevorzugte Quelle für die p12-Epoxygenase der Erfindung eine Pflanze, insbesondere *Crepis palaestina* oder eine weitere *Crepis* sp., die von *C. palaestina* verschieden ist, jedoch hohe Konzentrationsmengen an Vernolsäure enthält, *Vernonia galamensis* oder *Euphorbia lagascae*.

**[0072]** Gemäß dieser Ausführungsform kann eine p12-Epoxygenase die Umwandlung von Palmitoleinsäure in 9,10-Epoxy-palmitinsäure und/oder die Umwandlung von Ölsäure in 9,10-Epoxy-stearinsäure und/oder die Umwandlung von Linolsäure in eine oder mehrere Verbindungen von 9,10-Epoxy-12-octadecensäure oder 12,13-Epoxy-9-octadecensäure oder 9,10,12,13-Diepoxy-stearinsäure und/oder die Umwandlung von Linolensäure in eine oder mehrere Verbindungen von 9,10-Epoxy-12,15-octadecadiensäure oder 12,13-Epoxy-9,15-octadecadiensäure oder 15,16-Epoxy-octadecadiensäure oder 9,10,12,13-Diepoxy-15-octadecensäure oder 9,10,15,16-Diepoxy-12-octadecensäure oder 12,13,15,16-Diepoxy-9-octadecensäure oder 9,10,12,13,15,16-Triepoxystearinsäure und/oder die Umwandlung von Arachidonsäure in eine oder mehrere Verbindungen von 5,6-Epoxy-8,11,14-tetracosatriensäure oder 8,9-Epoxy-5,11,14-tetracosatriensäure oder 11,12-Epoxy-5,8,14-tetracosatriensäure oder 14,15-Epoxy-5,8,11-tetracosatriensäure oder 5,6,8,9-Diepoxy-11,14-tetracosadiensäure oder 5,6,11,12-Diepoxy-8,14-tetracosadiensäure oder 5,6,14,15-Diepoxy-8,11-tetracosadiensäure oder 8,9,11,12-Diepoxy-5,14-tetracosadiensäure oder 8,9,14,15-Diepoxy-5,11-tetracosadiensäure oder 11,12,14,15-Diepoxy-5,8-tetracosadiensäure oder 5,6,8,9,11,12-Triepoxy-14-tetracosensäure oder 5,6,8,9,14,15-Triepoxy-11-tetracosensäure oder 5,6,11,12,14,15-Triepoxy-8-tetracosensäure oder 8,9,11,12,14,15-Triepoxy-5-tetracosensäure unter anderem katalysieren.

**[0073]** Dem Fachmann ist klar, dass nicht alle oben aufgelisteten Substrate von einer natürlichen Quelle ableitbar sein können, doch ungeachtet dessen durch chemische synthetische Mittel produziert werden können. Die Umwandlung von sowohl natürlich vorkommenden als auch chemisch synthetisierten ungesättigten Fettsäuren in Epoxyfettsäuren liegt im Umfang der vorliegenden Erfindung und die einzige Anforderung besteht darin, dass das Nucleinsäuremolekül der vorliegenden Erfindung, das hierin beschrieben ist, für ein Enzym oder einen funktionalen Teil desselben codiert, das bzw. der zur Katalyse der Umwandlung fähig ist.

**[0074]** Gemäß der vorhergehenden Diskussion ist dem Fachmann klar, dass eine Fettsäureepoxygenase ein Cytochrom-P450-abhängiges Monooxygenaseenzym oder ein Monooxygenaseenzym gemischter Funktion oder alternativ ein peroxidabhängiges Peroxygenaseenzym oder ähnliches Enzym unter anderen sein kann. Jedoch ist die vorliegende Erfindung insbesondere auf die Epoxygenaseenzyme, die Monooxygenaseenzyme gemischter Funktion sind, und auf Nucleinsäuremoleküle mit Codierung für diese und Verwendungszwecke hierfür gerichtet. Entsprechend ist es besonders bevorzugt, wenn das Nucleinsäuremolekül der Erfindung für eine Fettsäureepoxygenase codiert, die ein Monooxygenaseenzym gemischter Funktion ist.

**[0075]** Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung soll der Ausdruck "Monooxygenaseenzym gemischter Funktion" so verstanden werden, dass er jedes Enzym bezeichnet, das die Epoxygenierung einer Kohlenstoffbindung oder Kohlenstoffdoppelbindung in ein Fettsäuremolekül katalysiert, wobei das Enzym ferner eine Aminosäuresequenz umfasst, die die im folgenden angegebenen drei histidinreichen Regionen enthält:

- (i) His-(Xaa)<sub>3-4</sub>-His,
- (ii) His-(Xaa)<sub>2-3</sub>-His-His und
- (iii) His-(Xaa)<sub>2-3</sub>-His-His,

worin His Histidin bezeichnet, Xaa einen beliebigen natürlich vorkommenden Aminosäurerest, der in der Tabelle 1 hierin angegeben ist, bezeichnet, die Einheit (Xaa)<sub>3-4</sub> eine Aminosäuresequenz, die drei oder vier Xaa-Repeats umfasst, bezeichnet und die Einheit (Xaa)<sub>2-3</sub> eine Aminosäuresequenz, die zwei oder drei Xaa-Repeats umfasst, bezeichnet.

**[0076]** Der Ausdruck "ähnlich einem Monooxygenaseenzym gemischter Funktion" soll jedes Enzym, das drei der oben aufgelisteten histidinreichen Regionen umfasst, bezeichnen.

**[0077]** In den hierin beschriebenen Beispielen der Erfindung zeigten die Erfinder auf, dass die hierin bereitgestellte Aminosäuresequenz von *Crepis palaestina* ein p12-Epoxygenaseenzym umfasst, das die charakteristischen Aminosäuresequenzmotive eines Monooxygenaseenzym gemischter Funktion, das hierin im vorhergehenden definiert ist, umfasst. Die enge Aminosäuresequenzidentität zwischen dem p12-Epoxygenaseenzym von *C. palaestina* (SEQ ID NO: 2) und den Aminosäuresequenzen von Polypeptiden, die von einer nichtidentifizierten *Crepis* sp. und *Vernonia galamensis* stammen, die hierin bereitgestellt sind (SEQ ID NO: 4 und 6), im Vergleich zu den Aminosäuresequenzen anderer Monooxygenasen gemischter Funktion, wie Desaturasen und Hydroxylasen, legt nahe, dass die Aminosäuresequenzen von *Crepis* sp. und *V. galamensis* auch Fettsäureepoxygenaseenzyme sind und p12-Epoxygenaseenzyme sein können. Im Hinblick darauf ist die Aminosäuresequenz von *Vernonia galamensis*, die hierin als Beispiel angegeben ist, eine partielle Sequenz, die nur ein vollständiges histidinreiches Motiv (d.h. His-Arg-Asn-His-His) und eine partielle Sequenz des ersten histidinreichen Motivs (d.h. sie umfasst die letzten zwei Histidinreste des His-Glu-Cys-Gly-His-His-Motivs) umfasst, da die entsprechende Nucleotidsequenz mit Codierung hierfür durch eine Polymerasekettenreaktion als partielle cDNA-Sequenz unter Verwendung eines ersten Primers für dieses erste histidinreiche Motiv und eines zweiten Amplifikationsprimers, der für eine Region strangaufwärts des dritten histidinreichen Motivs (d.h. His-Val-Met-His-His) gestaltet wurde, amplifiziert wurde. Zusätzlich zeigt die Tatsache, dass die Sequenz von *V. galamensis* unter Verwendung eines für das erste histidinreiche Motiv spezifischen Primers amplifiziert wurde, dass die entsprechende Sequenz voller Länge auch dieses Motiv umfasst.

**[0078]** Entsprechend codiert in einer besonders bevorzugten Ausführungsform das Nucleinsäuremolekül der Erfindung für ein Epoxygenaseenzym einer Monooxygenase gemischter Funktion oder ein ähnliches Enzym, das von *Crepis* spp., das *Crepis palaestina* umfasst, stammt oder alternativ von *Vernonia galamensis* stammt. Gemäß dieser Ausführungsform ist es noch günstiger, wenn die vorliegende Epoxygenase mindestens eine Aminosäuresequenz umfasst, die drei oder mehr der im folgenden angegebenen histidinreichen Regionen enthält:

- (i) His-Glu-Cys-Gly-His-His (SEQ ID NO: 15),
- (ii) His-Arg-Asn-His-His (SEQ ID NO: 16) und
- (iii) His-Val-Met-His-His (SEQ ID NO: 17)

oder ein Homologon, Analogon oder Derivat derselben umfasst, wobei His Histidin bezeichnet, Glu Glutamat bezeichnet, Cys Cystein bezeichnet, Gly Glycin bezeichnet, Arg Arginin bezeichnet, Asn Asparagin bezeichnet, Val Valin bezeichnet, Met Methionin bezeichnet.

**[0079]** Die vorliegende Erfindung erstreckt sich klar auf Epoxygenasegene, die von anderen Arten abgeleitet sind, die unter anderen die Epoxygenasegene umfassen, die von *Chrysanthemum* spp. und *Euphorbia lagascae* stammen.

**[0080]** In einer bevorzugten Ausführungsform, die die vorliegende Erfindung nicht beschränken soll, codieren die Epoxygenasegene anderer Arten, die durch die vorliegende Erfindung umfasst werden, für Monooxygenaseenzyme gemischter Funktion. Die vorliegende Erfindung erstreckt sich ferner auf die isolierten oder rekombinanten Polypeptide, die durch derartige Gene codiert werden, und die Verwendungsmöglichkeiten der Gene und Polypeptide.

**[0081]** Die gemäß dieser Ausführungsform beschriebene Erfindung umfasst keine Nucleinsäuremoleküle, die andere Enzymaktivitäten als Epoxygenaseaktivitäten, die hierin definiert sind, codieren, insbesondere die p12-Desaturaseenzyme, die von *Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea*, *Brassica napus* oder *Glycine max* stammen, unter anderen, von denen bekannt ist, dass sie ähnliche histidinreiche Motive enthalten.

**[0082]** Im vorliegenden Zusammenhang bezeichnen "Homologa" einer Aminosäuresequenz die Aminosäuresequenzen oder Peptidsequenzen, die von Polypeptiden, Enzymen oder Proteinen der vorliegenden Erfindung abgeleitet sind, oder alternativ entsprechen sie im wesentlichen den oben aufgelisteten Aminosäuresequenzen ungeachtet etwaiger natürlich vorkommender Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen derselben.

**[0083]** Beispielsweise können Aminosäuren durch andere Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften, beispielsweise Hydrophobie, Hydrophilie, hydrophobem Moment, Antigenizität, Neigung zur Bildung oder zum

Aufbrechen von  $\alpha$ -Helixstrukturen oder  $\beta$ -Faltblattstrukturen und dergleichen, ausgetauscht werden. Alternativ oder zusätzlich können die Aminosäuren einer homologen Aminosäuresequenz durch andere Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften, beispielsweise Hydrophobie, Hydrophilie, hydrophobem Moment, Ladung oder Antigenizität und dergleichen, ausgetauscht werden.

**[0084]** Natürlich vorkommende Aminosäurereste, die hierin betrachtet werden, sind in Tabelle 1 beschrieben.

**[0085]** Ein Homologon einer Aminosäuresequenz kann ein synthetisches Peptid, das durch ein beliebiges, dem Fachmann bekanntes Verfahren, beispielsweise unter Verwendung von Fmoc-Chemie, produziert wurde, sein.

**[0086]** Alternativ kann ein Homologon einer Aminosäuresequenz von einer natürlichen Quelle, beispielsweise der gleichen oder einer anderen Art wie die Polypeptide, Enzyme oder Proteine der vorliegenden Erfindung stammen. Bevorzugte Quellen für Homologa der im vorhergehenden aufgelisteten Aminosäuresequenzen umfassen jede der hierin betrachteten Quellen.

**[0087]** "Analoge" einer Aminosäuresequenz umfassen die Aminosäuresequenzen, die mit den im vorhergehenden aufgelisteten Aminosäuresequenzen im wesentlichen identisch sind, ungeachtet des Auftretens von etwaigen nicht natürlich vorkommenden Aminosäureanaloge in diesen.

**[0088]** Bevorzugte nicht natürlich vorkommende Aminosäuren, die hierin betrachtet werden, sind im folgenden in Tabelle 2 aufgelistet.

**[0089]** Der Ausdruck "Derivat" in Bezug auf eine Aminosäure soll hierin im folgenden so verstanden werden, dass er Mutanten, Teile, Fragmente oder Polypeptidfusionen der im vorhergehenden aufgelisteten Aminosäuresequenzen bezeichnet. Derivate umfassen modifizierte Aminosäuresequenzen oder Peptide, wobei Ligan den an einen oder mehrere der darin enthaltenen Aminosäurereste, beispielsweise Kohlehydrate, Enzyme, Proteine, Polypeptide oder Reportermoleküle, wie Radionuclide oder fluoreszierende Verbindungen, gebunden sind. Glycosylierte, fluoreszierende, acylierte oder alkylierte Formen der vorliegenden Peptide werden durch die vorliegende Erfindung ebenfalls betrachtet. Ferner können Derivate Fragmente oder Teile einer hierin offenbarten Aminosäuresequenz umfassen und sie liegen im Umfang der Erfindung, wie auch Homopolymere oder Heteropolymere, die zwei oder mehrere Kopien der vorliegenden Sequenzen umfassen.

**[0090]** Verfahren zur Derivatisierung von Peptiden sind einschlägig bekannt.

**[0091]** Substitutionen umfassen Aminosäureänderungen, wobei eine Aminosäure durch einen anderen natürlich vorkommenden oder unüblichen Aminosäurerest ersetzt ist. Derartige Substitutionen können als "konservativ" klassifiziert werden, wobei in diesem Fall ein Aminosäurerest durch eine andere natürlich vorkommende Aminosäure eines ähnlichen Charakters ersetzt ist, beispielsweise Gly1Ala, Val1Ile1Leu, Asp1Glu, Lys1Arg, Asn1Gln oder Phe1Trp1Tyr.

**[0092]** Durch die vorliegende Erfindung umfasste Substitutionen können auch "nichtkonservativ" sein, wobei ein Aminosäurerest, der in einem Repressorpolypeptid vorhanden ist, durch eine Aminosäure mit unterschiedlichen Eigenschaften, beispielsweise eine natürlich vorkommende Aminosäure von einer unterschiedlichen Gruppe, ersetzt ist (beispielsweise Substitution einer geladenen oder hydrophoben Aminosäure durch Alanin) oder wobei alternativ eine natürlich vorkommende Aminosäure durch eine unübliche Aminosäure ersetzt ist.

**[0093]** Aminosäuresubstitutionen sind typischerweise solche einzelner Reste, können jedoch solche von mehreren Resten, entweder geclustert oder verteilt, sein.

**[0094]** Aminosäuredeletionen sind üblicherweise von der Größenordnung von etwa 1–10 Aminosäureresten, während Insertionen von einer beliebigen Länge sein können. Deletionen und Insertionen können am N-Terminus, C-Terminus erfolgen oder innere Deletionen oder Insertionen sein. Allgemein sind Insertionen in der Aminosäuresequenz kleiner als amino- oder carboxylterminale Fusionen und von der Größenordnung von 1–4 Aminosäureresten.

**[0095]** Die vorliegende Erfindung erstreckt sich klar auf das vorliegende isolierte Nucleinsäuremolekül, wenn es in das Genom einer Zelle zusätzlich zu dem endogenen zellulären Komplement von Epoxygenasegenen integriert ist. Alternativ erstreckt sich die vorliegende Erfindung, wenn die Wirtszelle nicht normalerweise für Enzyme codiert, die zur Epoxyfettsäurebiosynthese erforderlich sind, auf das vorliegende isolierte Nucleinsäu-

remolekül, wenn es in das Genom der Zelle zusätzlich zum endogenen zellulären Genom integriert ist.

TABELLE 1

Aminosäure	Dreibuchstaben- abkürzung	Einbuchstaben- symbol
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Beliebige Aminosäure wie oben	Xaa	X

TABELLE 2

Unübliche Aminosäure	Code	Unübliche Aminosäure	Code
$\alpha$ -Aminobuttersäure	Abu	L-N-Methylalanin	Nmala
$\alpha$ -Amino- $\alpha$ -methylbutyrat	Mgab	L-N-Methylarginin	Nmarg
Aminocyclopropan-carboxylat	Cpro	L-N-Methylasparagin	Nmasn
Aminoisobuttersäure	Aib	L-N-Methylaspara-ginsäure	Nmasp
Aminonorbornyl-carboxylat	Norb	L-N-Methylcystein	Nmcys
Cyclohexylalanin	Chexa	L-N-Methylglutamin	Nmgln
Cyclopentylalanin	Cpen	L-N-Methylglutaminsäure	Nmglu
D-Alanin	Dal	L-N-Methylhistidin	Nmhis
D-Arginin	Darg	L-N-Methylisoleucin	Nmile
D-Asparaginsäure	Dasp	L-N-Methylleucin	Nmleu
D-Cystein	Dcys	L-N-Methyllysin	Nmlys
D-Glutamin	Dgln	L-N-Methylmethionin	Nmmet
D-Glutaminsäure	Dglu	L-N-Methylnorleucin	Nmnle
D-Histidin	Dhis	L-N-Methylnorvalin	Nmnva
D-Isoleucin	Dile	L-N-Methylornithin	Nmorn
D-Leucin	Dleu	L-N-Methylphenylalanin	Nmphe
D-Lysin	Dlys	L-N-Methylprolin	Nmpro
D-Methionin	Dmet	L-N-Methylserin	Nmser
D-Ornithin	Dorn	L-N-Methylthreonin	Nmthr
D-Phenylalanin	Dphe	L-N-Methyltryptophan	Nmtrp
D-Prolin	Dpro	L-N-Methyltyrosin	Nmtyr
D-Serin	Dser	L-N-Methylvalin	Nmval
D-Threonin	Dthr	L-N-Methylethylglycin	Nmetg
		L-N-Methyl-tert-butylglycin	Nmtbug
		L-Norleucin	Nle

D-Tryptophan	Drtp	L-Norvalin	Nva
D-Tyrosin	Dtyr	$\alpha$ -Methyl-aminoisobutyrat	Maib
D-Valin	Dval	$\alpha$ -Methyl- $\gamma$ -aminobutyrat	Mgab
D- $\alpha$ -Methylalanin	Dmala	$\alpha$ -Methylcyclohexylalanin	Mchexa
D- $\alpha$ -Methylarginin	Dmarg	$\alpha$ -Methylcyclopentylalanin	Mcpen
D- $\alpha$ -Methylasparagin	Dmasn	$\alpha$ -Methyl- $\alpha$ -naphthylalanin	Manap
D- $\alpha$ -Methylaspartat	Dmasp	$\alpha$ -Methylpenicillamin	Mpen
D- $\alpha$ -Methylcystein	Dmcys	N-(4-Aminobutyl)glycin	Nglu
D- $\alpha$ -Methylglutamin	Dmgln	N-(2-Aminoethyl)glycin	Naeg
D- $\alpha$ -Methylhistidin	Dmhis	N-(3-Aminopropyl)glycin	Nron
D- $\alpha$ -Methylisoleucin	Dmile	N-Amino- $\alpha$ -methylbutyrat	Nmaabu
D- $\alpha$ -Methylleucin	Dmleu	$\alpha$ -Naphthylalanin	Anap
D- $\alpha$ -Methyllysin	Dmlys	N-Benzylglycin	Nphe
D- $\alpha$ -Methylmethionin	Dmmet	N-(2-Carbamylethyl)glycin	Nglu
D- $\alpha$ -Methylornithin	Dmorn	N-(Carbamylmethyl)glycin	Nasn
D- $\alpha$ -Methylphenyl- alanin	Dmphe	N-(2-Carboxyethyl)glycin	Nglu
		N-(Carboxymethyl)glycin	Nasp
D- $\alpha$ -Methylprolin	Dmpro	N-Cyclobutylglycin	Ncbut
D- $\alpha$ -Methylserin	Dmser	N-Cycloheptylglycin	Nchep
D- $\alpha$ -Methylthreonin	Dmthr	N-Cyclhexylglycin	Nchex
D- $\alpha$ -Methyltrypto- phan	Dmtrp	N-Cyclodecylglycin	Ncdec
		N-Cyclododecylglycin	Ncdod
D- $\alpha$ -Methyltyrosin	Dmtty	N-Cyclooctylglycin	Ncoct
D- $\alpha$ -Methylvalin	Dmval	N-Cyclopropylglycin	Ncpro
D-N-Methylalanin	Dnmala	N-Cycloundecylglycin	Ncund
D-N-Methylarginin	Dnmarg	N-(2,2-Diphenylethyl)glycin	Nbhm
D-N-Methylasparagin	Dnmasn	N-(3,3-Diphenyl-	Nbhe
D-N-Methylaspartat	Dnmasp	propyl)glycin	
D-N-Methylcystein	Dnmcys		

D-N-Methylglutamin	Dnmgln	N-(3-Guanidinopropyl)gly-	Narg
D-N-Methylglutamat	Dnmglu	cin	
D-N-Methylhistidin	Dnmhis	N-(1-Hydroxyethyl)glycin	Nthr
D-N-Methylisoleucin	Dnmile	N-(Hydroxyethyl)glycin	Nser
D-N-Methylleucin	Dnmleu	N-(Imidazolethyl)glycin	Nhis
D-N-Methyllysin	Dnmlys	N-(3-Indolylethyl)glycin	Nhtrp
N-Methylcyclohexyl-	Nmchexa	N-Methyl- $\gamma$ -aminobutyrat	Nmgabu
alanin		D-N-Methylmethionin	Dnmmt
D-N-Methylornithin	Dnmorn	N-Methylcyclopentylalanin	Nmcpn
N-Methylglycin	Nala	D-N-Methylphenylalanin	Dnmphe
N-Methylaminoiso-	Nmaib	D-N-Methylprolin	Dnmpro
butyrate		D-N-Methylserin	Dnmser
N-(1-Methyl-	Nile	D-N-Methylthreonin	Dnmthr
propyl)glycin		N-(1-Methylethyl)glycin	Nval
N-(2-Methyl-	Nleu	N-Methyl- $\alpha$ -naphthylalanin	Nmanap
propyl)glycin		N-Methylpenicillamin	Nmpen
D-N-Methyltrypto-	Dnmtrp	N-(p-Hydroxyphenyl)glycin	Nhtyr
phan		N-(Thiomethyl)glycin	Ncys
D-N-Methyltyrosin	Dnmtyr	Penicillamin	Pen
D-N-Methylvalin	Dnmval	L- $\alpha$ -Methylalanin	Mala
$\gamma$ -Aminobuttersäure	Gabu	L- $\alpha$ -Methylasparagin	Masn
L-tert-Butylglycin	Tbug	L- $\alpha$ -Methyl-tert-	Mtbug
L-Ethylglycin	Etg	butylglycin	
L-Homophenylalanin	Hphe	L-Methylethylglycin	Metg
L- $\alpha$ -Methylarginin	Marg	L- $\alpha$ -Methylglutamat	Mglu
L- $\alpha$ -Methylaspartat	Masp	L- $\alpha$ -Methylhomophenylalanin	Mhphe
L- $\alpha$ -Methylcystein	Mcys	N-(2-Methylthio-	Nmet
L- $\alpha$ -Methylglutamin	Mgln	ethyl)glycin	
L- $\alpha$ -Methylhistidin	Mhis		
L- $\alpha$ -Methylisoleucin	Mile		



L- $\alpha$ -Methylleucin	Mleu	L- $\alpha$ -Methyllysin	Mlys
L- $\alpha$ -Methylmethionin	Mmet	L- $\alpha$ -Methylnorleucin	Mnle
L- $\alpha$ -Methylnorvalin	Mnva	L- $\alpha$ -Methylornithin	Morn
L- $\alpha$ -Methylphenyl- alanin	Mphe	L- $\alpha$ -Methylprolin	Mpro
L- $\alpha$ -Methylserin	Mser	L- $\alpha$ -Methylthreonin	Mthr
L- $\alpha$ -Methyltryptophan	Mtrp	L- $\alpha$ -Methyltyrosin	Mtyr
L- $\alpha$ -Methylvalin	Mval	L-N-Methylhomophenyl- alanin	Nmhpe
N- (N- (2,2-Diphe- nylethyl) carbamyl- methyl) glycin	Nnhbm	N- (N- (3,3-Diphenyl- propyl) carbamylmethyl) - glycin	Nnhbe
1-Carboxy-1- (2,2- diphenyl-ethyl- amino) cyclopropan	Nmbc		

**[0096]** Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bereit, das die Nucleotidsequenz, die in einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1 oder 3 oder 5 oder 19 oder 20 angegeben ist, oder eine hierzu komplementäre Sequenz oder ein Homologon, Analogon oder Derivat derselben umfasst.

**[0097]** Für Nomenklaturzwecke ist die in SEQ ID NO: 1 angegebene Nucleotidsequenz von *Crepis palaestina* abgeleitet und sie codiert für die Monooxygenasesequenz gemischter Funktion oder die einer Monooxygenase gemischter Funktion ähnliche Sequenz, die in SEQ ID NO: 2 angegeben ist. Wie hierin als Beispiel angegeben ist, weist die in SEQ ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz Epoxygenaseaktivität, insbesondere p12-Epoxygenaseaktivität auf.

**[0098]** Die in SEQ ID NO: 3 angegebene Nucleotidsequenz entspricht einer cDNA, die von einer anderen *Crepis* sp. als *C. palaestina* stammt, die hohe Konzentrationsmengen Vernolsäure enthält. Die in SEQ ID NO: 4 angegebene Aminosäuresequenz entspricht der abgeleiteten Aminosäuresequenz des in SEQ ID NO: 3 bereitgestellten Epoxygenasegens von *Crepis* sp..

**[0099]** Die in SEQ ID NO: 5 angegebene Nucleotidsequenz entspricht amplifizierter DNA, die von *Vernonia galamensis* unter Verwendung von Amplifikationsprimern, die von einer Konsensussequenz von Monooxygenasen gemischter Funktion, die die Epoxygenasegensequenzen von *Crepis* spp. gemäß der Erfindung umfassen, abgeleitet sind, abgeleitet wurde. Die amplifizierte DNA umfasst eine partielle Epoxygenasegensequenz, die Nucleotidsequenzen mit der Fähigkeit zur Codierung des histidinreichen Motivs His-Arg-Asn-His-His, das für Monooxygenaseenzyme gemischter Funktion charakteristisch ist, umfasst. Die in SEQ ID NO: 6 angegebene Aminosäuresequenz entspricht der abgeleiteten Aminosäuresequenz des in SEQ ID NO: 5 bereitgestellten Epoxygenasegens von *Vernonia galamensis*.

**[0100]** Die in SEQ ID NO: 7 angegebene Nucleotidsequenz betrifft die partielle Sequenz eines Acetylenasegens von *Crepis alpina*, das als Sonde zur Isolierung des Nucleinsäuremoleküls, das die in SEQ ID NO: 1 angegebene Nucleotidsequenz umfasst, verwendet wurde. Die in SEQ ID NO: 8 angegebene Aminosäuresequenz entspricht der abgeleiteten Aminosäuresequenz der partiellen Sequenz des Acetylenasegens von *C. alpina*.

**[0101]** Der hier verwendete Ausdruck "Acetylenase" soll ein Enzym bezeichnen, das zur Katalyse der Umwandlung einer Kohlenstoffdoppelbindung in einem Fettsäuresubstratmolekül in eine Kohlenstoffdreifachbindung fähig ist oder alternativ zur Katalyse der Bildung einer Kohlenstoffdreifachbindung in einem Fettsäuremolekül fähig ist.

**[0102]** Die in SEQ ID NO: 18 angegebene Nucleotidsequenz entspricht einem entarteten Amplifikationsprimer, der zur Amplifikation vermuteter Epoxygenasegensequenzen von *Euphorbia lagascae* verwendet wurde. Im Hinblick darauf sind die in SEQ ID NO: 18 angegebenen Nucleotidreste die durch die IUPACIUB Biochemical Nomenclature Commission empfohlenen, wobei A für Adenin steht, C für Cytosin steht, G für Guanin steht, T für Thymin steht, Y für einen Pyrimidinrest steht, R für einen Purinrest steht, M für Adenin oder Cytosin steht,

K für Guanin oder Thymin steht, S für Guanin oder Cytosin steht, W für Adenin oder Thymin steht, H für ein anderes Nucleotid als Guanin steht, W für ein anderes Nucleotid als Adenin steht, V für ein anderes Nucleotid als Thymin steht, D für ein anderes Nucleotid als Cytosin steht und N für einen beliebigen Nucleotidrest steht.

**[0103]** Die in SEQ ID NO: 19 angegebene Nucleotidsequenz stammt von *Euphorbia lagascae* und sie codiert für die vermutliche Cytochrom-P-450-abhängige Monooxygenasesequenz oder eine einer Cytochrom-P-450-abhängigen Monooxygenase ähnliche Sequenz.

**[0104]** Die in SEQ ID NO: 20 angegebene Nucleotidsequenz stammt von *Euphorbia lagascae* und sie codiert für die vermutliche Cytochrom-P-450-abhängige Monooxygenasesequenz oder eine einer Cytochrom-P-450-abhängigen Monooxygenase ähnliche Sequenz.

**[0105]** Die vorliegende Erfindung erstreckt sich klar auf die Genomgenäquivalente der cDNA-Moleküle, die als Beispiele in einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1, 3, 5, 19 oder 20 angegeben sind.

**[0106]** In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein isoliertes Nucleinsäuremolekül, das die in einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1, 3, 5, 19 oder 20 angegebene Nucleotidsequenz oder ein Genomgenäquivalent der Nucleotidsequenz oder ein Homologon, Analogon oder Derivat derselben umfasst, bereit.

**[0107]** Für den vorliegenden Zweck sollen "Homologa" einer Nucleotidsequenz so verstanden werden, dass sie ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bezeichnen, das im wesentlichen gleich dem Nucleinsäuremolekül der vorliegenden Erfindung ist oder eine hierzu komplementäre Nucleotidsequenz ist, ungeachtet des Auftretens von einer oder mehreren Nucleotidsubstitutionen, -insertionen, -deletionen oder Umlagerungen in der Sequenz.

**[0108]** "Analoge" einer hierin angegebenen Nucleotidsequenz sollen so verstanden werden, dass sie ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bezeichnen, das im wesentlichen gleich einem Nucleinsäuremolekül der vorliegenden Erfindung ist oder eine hierzu komplementäre Nucleotidsequenz ist, ungeachtet des Auftretens beliebiger Nichtnucleotidbestandteile, die normalerweise in dem isolierten Nucleinsäuremolekül vorhanden sind, beispielsweise Kohlehydrate, radiochemische Stoffe, die Radionucleotide umfassen, Reportermoleküle, beispielsweise, ohne hierauf beschränkt zu sein, DIG, alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase unter anderen.

**[0109]** "Derivate" einer Nucleotidsequenz, die hierin angegeben sind, sollen so verstanden werden, dass sie ein beliebiges isoliertes Nucleinsäuremolekül bezeichnen, das signifikante Sequenzähnlichkeit mit der Sequenz oder einem Teil derselben enthält.

**[0110]** Allgemein werden Homologa, Analoga oder Derivate des Nucleinsäuremoleküls der Erfindung durch synthetische Mittel erzeugt oder alternativ von natürlich vorkommenden Quellen abgeleitet. Beispielsweise kann die Nucleotidsequenz der vorliegenden Erfindung einer Mutagenese unter Bildung von Einzel- oder Mehrfachnucleotidsubstitutionen, -deletionen und/oder -insertionen, wie im vorhergehenden angegeben, unterzogen werden.

**[0111]** In einer Ausführungsform der Erfindung codieren bevorzugte Homologa, Analoga oder Derivate der Nucleotidsequenzen, die in einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1, 3, 5, 19 oder 20 angegeben sind, oder hierfür komplementäre Sequenzen für immunologisch aktive oder enzymatisch aktive Polypeptide.

**[0112]** Der hier verwendete Ausdruck "immunologisch aktiv" soll so verstanden werden, dass er die Fähigkeit eines Polypeptidmoleküls zum Auslösen einer Immunantwort in einem Säuger, insbesondere einer Immunantwort, die zur Bildung eines Antikörpermoleküls, beispielsweise, ohne hierauf beschränkt zu sein, eines IgM- oder IgG-Moleküls, oder eines Vollserums, das das Antikörpermolekül enthält, ausreichend ist, bezeichnet. Der Ausdruck "immunologisch aktiv" erstreckt sich auch auf die Fähigkeit eines Polypeptids zum Auslösen einer ausreichenden Immunantwort zur Bildung monoklonaler Antikörper, synthetischer Fab-Fragmente eines Antikörpermoleküls, eines Einzelkettenantikörpermoleküls oder sonstigen immuninteraktiven Moleküls.

**[0113]** Der hier verwendete Ausdruck "enzymatisch aktiv" soll so verstanden werden, dass er die Fähigkeit eines Polypeptidmoleküls zur Katalyse einer Enzymreaktion, insbesondere einer Enzymreaktion, die die Epoxygenisierung einer Kohlenstoffbindung in einem Fettsäuresubstratmolekül umfasst, bezeichnet. Insbesondere kann der Ausdruck "enzymatisch aktiv", ohne die Erfindung zu beschränken, auch die Fähigkeit eines Poly-

peptidmoleküls zur Katalyse der Epoxygenierung von p-9 oder p-12 in einem Fettsäuresubstratmolekül, wie Linolsäure oder Vernolsäure, bezeichnen.

**[0114]** In einer alternativen Ausführungsform umfasst ein bevorzugtes Homologon, Analogon oder Derivat der Nucleotidsequenz, die in einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1 oder 3 oder 5 angegeben ist, oder eine hierzu komplementäre Sequenz eine Nucleotidsequenz, die zu mindestens 65 % mit mindestens 20 fortlaufenden Nucleotiden darin identisch ist, außer einer Nucleotidsequenz, die für ein Acetylenaseenzym von *Crepis* sp. codiert.

**[0115]** Noch besser beträgt die prozentuale Identität mit einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1 oder 3 oder 5 mindestens etwa 85 %. Noch besser ist ein Homologon, Analogon oder Derivat von SEQ ID NO: 1 oder 3 oder 5 zu mindestens etwa 90 % und noch besser zu mindestens etwa 95 % identisch mit mindestens 100 oder 250 oder 500 oder 1000 fortlaufenden Nucleotiden darin.

**[0116]** Die prozentuale Identität mit SEQ ID NO: 19 oder 20 oder hierzu komplementären Sequenzen beträgt mindestens etwa 75 % über mindestens etwa 200 fortlaufende Nucleotide, noch günstiger mindestens etwa 80 %, noch günstiger mindestens etwa 90 % und noch besser mindestens etwa 95 %, wobei mindestens etwa 99 % Identität umfasst werden. Nucleotidsequenzen, die mindestens 65 % über mindestens etwa 400 fortlaufende Nucleotide in SEQ ID NO: 19 oder 20 sind, liegen ebenfalls im Umfang der Erfindung.

**[0117]** Ein hierin angegebener Verweis auf prozentuale Identität oder prozentuale Ähnlichkeit zwischen zwei oder mehreren Nucleotid- oder Aminosäuresequenzen soll auf die Zahl identischer oder ähnlicher Reste in einem Nucleotid- oder Aminosäuresequenzalignement, das unter Verwendung eines dem Fachmann bekannten Standardalgorithmus bestimmt wurde, bezeichnen. Insbesondere können Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzidentitäten und -ähnlichkeiten unter Verwendung des Gap-Programms, das den Algorithmus von Needleman und Wunsch (1970) zur Maximierung der Zahl der Übereinstimmungen von Resten und Minimierung der Zahl der Sequenzlücken verwendet, berechnet werden. Das Gap-Programm ist Teil des Sequence and Analysis Software Package der Computer Genetics Group Inc., University Research Park, Madison, Wisconsin, USA (Devereux et al., 1984).

**[0118]** In einer weiteren alternativen Ausführungsform hybridisiert ein bevorzugtes Homologon, Analogon oder Derivat der Nucleotidsequenz, die in einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1, 3, 5, 19 oder 20 angegeben ist, oder eine hierzu komplementäre Sequenz unter Bedingungen von mindestens niedriger Stringenz mit mindestens 20 fortlaufenden Nucleotiden, die von der Sequenz abgeleitet sind.

**[0119]** Noch günstiger ist die Stringenz der Hybridisierung eine mindestens mäßige Stringenz, noch besser eine mindestens hohe Stringenz.

**[0120]** Zum Zwecke der Festlegung des Stringenzgrades ist dem Fachmann klar, dass mehrere unterschiedliche Hybridisierungsbedingungen verwendet werden können. Beispielsweise kann eine niedrige Stringenz eine Hybridisierung und/oder eine Wäsche, die in 6 × SSC-Puffer, 0,1 % (Gew/V) SDS bei 28 °C durchgeführt wird, umfassen. Mäßige Stringenz kann eine Hybridisierung und/oder Wäsche, die in 2 × SSC-Puffer, 0,1 % (Gew/V) SDS bei einer Temperatur im Bereich von 45 °C bis 65 °C durchgeführt wird, umfassen. Hohe Stringenz kann eine Hybridisierung und/oder Wäsche, die in 0,1 × SSC-Puffer, 0,1 % (Gew/V) SDS bei einer Temperatur von mindestens 65 °C durchgeführt wird, umfassen.

**[0121]** Allgemein wird die Stringenz durch Verringerung der Konzentration von SSC-Puffer und/oder die Erhöhung der Konzentration von SDS im Hybridisierungspuffer oder Waschpuffer und/oder Erhöhung der Temperatur, bei der die Hybridisierung und/oder Wäsche durchgeführt werden, erhöht. Bedingungen für Hybridisierungen und Waschvorgänge sind dem Fachmann üblicher Erfahrung klar. Zum Zwecke der Klarstellung von Parametern, die die Hybridisierung zwischen Nucleinsäuremolekülen beeinflussen, kann allgemein auf die Seiten 2.10.8 bis 2.10.16 von Ausubel et al. (1987), das hierdurch als Bezug aufgenommen ist, verwiesen werden.

**[0122]** Die hierin offenbarten isolierten Nucleinsäuremoleküle können zur Isolierung oder Identifizierung von Homologa, Analoga oder Derivaten derselben aus anderen Zellen, Geweben oder Organtypen oder Zellen, Geweben oder Organen einer anderen Art unter Verwendung von einem einer Zahl von Mitteln, die dem Fachmann geläufig sind, verwendet werden.

**[0123]** Beispielsweise kann genomische DNA oder mRNA oder cDNA unter Bedingungen einer Hybridisierung von mindestens niedriger Stringenz oder äquivalenten Bedingungen mit einer zur Hybridisierung wirksa-

men Menge eines isolierten Nucleinsäuremoleküls, das die in einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1, 3, 5, 19 oder 20 angegebene Nucleotidsequenz oder eine hierzu komplementäre Sequenz oder einen funktionellen Teil derselben umfasst, in Kontakt gebracht werden und eine Hybridisierung unter Verwendung eines Detektionsmittels detektiert werden.

**[0124]** Das Detektionsmittel kann ein Reportermolekül mit der Fähigkeit zur Bildung eines identifizierbaren Signals (beispielsweise ein Radioisotop, wie  $^{32}\text{P}$  oder  $^{35}\text{S}$ , oder ein biotinyliertes Molekül), das kovalent an das isolierte Nucleinsäuremolekül der Erfindung gebunden ist, sein.

**[0125]** In einem alternativen Verfahren ist das Detektionsmittel ein bekanntes Format der Polymerasekettenreaktion (PCR). Gemäß diesem Verfahren werden entartete Pools von Nucleinsäure-"Primermolekülen" einer Länge von etwa 15–50 Nucleotiden auf der Basis der in SEQ ID NO: 1, 3, 5, 19 oder 20 offenbarten Nucleotidsequenzen oder einer hierzu komplementären Sequenz gestaltet. Die Homologa, Analoga oder Derivate (d.h. das "Templatmolekül") werden an zwei der Primermoleküle derart hybridisiert, dass ein erster Primer mit einer Region auf einem Strang des Templatmoleküls hybridisiert und ein zweiter Primer mit einer komplementären Sequenz desselben hybridisiert, wobei der erste und zweite Primer nicht in gleichen oder überlappenden Regionen des Templatmoleküls hybridisiert sind und wobei jeder Primer in 5'→3'-Orientierung, bezogen auf die Position, in der der andere Primer an dem entgegengesetzten Strang hybridisiert ist, positioniert ist. Spezifische Nucleinsäuremolekülkopien des Templatmoleküls werden enzymatisch in einer Polymerasekettenreaktion, einer Technik, die dem Fachmann geläufig ist, amplifiziert.

**[0126]** Die Primermoleküle können jeden natürlich vorkommenden Nucleotidrest (d.h. Adenin, Cytidin, Guanin, Thymin) umfassen und/oder Inosin oder funktionale Analoga oder Derivate derselben, die in ein Polynucleotid eingearbeitet werden können, umfassen. Die Nucleinsäureprimermoleküle können auch in einem wässrigen Gemisch anderer Nucleinsäureprimermoleküle enthalten sein oder in einer im wesentlichen reinen Form sein.

**[0127]** Die detektierte Sequenz kann in einer rekombinanten Form, in einem Viruspartikel, Bakteriophagenpartikel, einer Hefezelle, Tierzelle oder Pflanzenzelle sein. Vorzugsweise stammen die verwandten Gensequenzen von einer anderen Pflanzenart.

**[0128]** Ein dritter Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bereit, das die in einer der Sequenzen SEQ ID NO: 2 oder 4 oder 6 angegebene Aminosäuresequenz oder ein Homologon, Analogon oder Derivat derselben umfasst.

**[0129]** In einer hierin betrachteten Ausführungsform sind bevorzugte Homologa, Analoga oder Derivate der in SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 angegebenen Aminosäuresequenzen immunologisch aktive oder enzymatisch aktive Polypeptide gemäß der obigen Definition.

**[0130]** In einer alternativen Ausführungsform der Erfindung umfassen bevorzugte Homologa, Analoga oder Derivate der Aminosäuresequenz, die in einer Sequenz von SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 angegeben sind, eine Aminosäuresequenz, die zu mindestens 60 % hiermit identisch ist, außer ein Acetylenasepolypeptid von *Crepis* sp.. Noch günstiger sind Homologa, Analoga oder Derivate von SEQ ID NO: 2 oder 4 oder 6, die von der vorliegenden Erfindung umfasst werden, zu mindestens etwa 85 % identisch, noch günstiger mindestens etwa 90 % identisch und noch besser mindestens etwa 95 % identisch und noch besser mindestens etwa 99 %–100 % hiermit identisch.

**[0131]** Homologa, Analoga oder Derivate von einer der Sequenzen SEQ ID NO: 2 oder 4 oder 6 können ferner eine histidinreiche Region gemäß der obigen Definition umfassen. Noch günstiger umfasst die vorliegende Epoxygenase mindestens eine Aminosäuresequenz, die drei oder mehrere histidinreiche Regionen, die im folgenden angegeben sind, enthält:

- (i) His-Glu-Cys-Gly-His-His (SEQ ID NO: 15),
- (ii) His-Arg-Asn-His-His (SEQ ID NO: 16) und
- (iii) His-Val-Met-His-His (SEQ ID NO: 17)

oder ein Homologon, Analogon oder Derivat derselben.

**[0132]** Die gemäß dieser alternativen Ausführungsform beschriebene Erfindung umfasst nicht p12-Desaturaseenzyme, die unter anderen von *Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea*, *Brassica napus* oder *Glycine max* abgeleitet sind.

**[0133]** Das isolierte Nucleinsäuremolekül der vorliegenden Erfindung ist zur Entwicklung von Genkonstrukten verwendbar, die ein Sense-Molekül umfassen, wobei die Genkonstrukte für die Expression in einer Zelle, die das Nucleinsäuremolekül normalerweise nicht exprimiert, oder zur Überexpression des Nucleinsäuremoleküls in einer Zelle, die das Nucleinsäuremolekül normalerweise exprimiert, gestaltet sind.

**[0134]** Entsprechend stellt ein weiterer Aspekt der Erfindung ein Genkonstrukt bereit, das ein Sense-Molekül, das funktional mit einer Promotorsequenz verbunden ist, umfasst.

**[0135]** Der hier verwendete Ausdruck "Sense-Molekül" soll so verstanden werden, dass er ein isoliertes Nucleinsäuremolekül bezeichnet, das eine Fettsäureepoxygenase codiert oder komplementär zu einem eine Fettsäureepoxygenase codierenden isolierten Nucleinsäuremolekül ist, wobei das Nucleinsäuremolekül in einem Format bereitgestellt wird, das zur Expression unter Bildung eines rekombinanten Polypeptids geeignet ist, wenn das Sense-Molekül in eine Wirtszelle durch Transfektion oder Transformation eingeführt wird.

**[0136]** Dem Fachmann ist klar, dass ein Genkonstrukt zur "Transfektion" einer Zelle verwendet werden kann, wobei es in diesem Fall in die Zelle ohne Integration in das Genom der Zelle eingeführt wird. Alternativ kann ein Genkonstrukt zur "Transformation" einer Zelle verwendet werden, wobei es in diesem Fall stabil in das Genom der Zelle integriert wird.

**[0137]** Ein Sense-Molekül, das einer Fettsäureepoxygenasegenesequenz oder einem Homologon, Analogon oder Derivat derselben entspricht, kann in eine Zelle unter Verwendung eines bekannten Verfahrens zur Transfektion oder Transformation der Zelle eingeführt werden. Wenn eine Zelle durch das Genkonstrukt der Erfindung transformiert ist, kann ein ganzer Organismus aus einer einzigen transformierten Zelle unter Verwendung eines dem Fachmann bekannten Verfahrens regeneriert werden.

**[0138]** Daher können die hierin beschriebenen Epoxygenasegene zur Entwicklung einzelner Zellen oder ganzer Organismen verwendet werden, die Epoxyfettsäuren, die normalerweise von wilden oder natürlich vorkommenden Organismen, die zu den gleichen Gattungen oder Arten wie die Gattungen oder Arten, von denen die transfigierte oder transformierte Zelle abgeleitet ist, gehören, synthetisieren, oder zur Erhöhung der Konzentrationen von derartigen Fettsäuren über die normalerweise in derartigen wilden oder natürlich vorkommenden Organismen gefundenen Konzentrationen verwendet werden.

**[0139]** In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform ist das isolierte Nucleinsäuremolekül der Erfindung zur Verringerung der Konzentration von Epoxyfettsäuren in einer Zelle fähig, wenn es darin in Antisense-Orientierung oder als Ribozym oder Cosuppressionsmolekül unter der Kontrolle einer geeigneten Promotorsequenz exprimiert wird.

**[0140]** Eine Cosuppression ist die Verringerung der Expression eines endogenen Gens, die auftritt, wenn eine oder mehrere Kopien des Gens oder eine oder mehrere Kopien eines im wesentlichen ähnlichen Gens in die Zelle eingeführt werden. Die vorliegende Erfindung erstreckt sich auch auf die Verwendung einer Cosuppression zur Hemmung der Expression eines Epoxygenasegens, das hierin beschrieben ist.

**[0141]** Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung ist ein Antisense-Molekül ein RNA-Molekül, das ausgehend von dem komplementären Strang eines nukleären Gens gegenüber einem, der normalerweise unter Bildung eines "Sense"-mRNA-Moleküls, das in ein Polypeptid translatiert werden kann, transkribiert wird, transkribiert wird. Das Antisense-Molekül ist daher komplementär zu der Sense-mRNA oder einem Teil derselben. Obwohl die Wirkungsweise der Antisense-Moleküle der vorliegenden Erfindung nicht auf einen speziellen Mechanismus beschränkt wird, besitzt das Antisense-RNA-Molekül die Fähigkeit zur Bildung einer doppelsträngigen mRNA durch Basenpaarung mit der Sense-mRNA, was eine Translation der Sense-mRNA und anschließende Synthese eines Polypeptidgenprodukts verhindern kann.

**[0142]** Ribozyme sind synthetische RNA-Moleküle, die eine Hybridisierungsregion umfassen, die zu zwei Regionen von jeweils mindestens 5 fortlaufenden Nucleotidbasen in der Ziel-Sense-mRNA komplementär ist. Ferner besitzen Ribozyme eine hochspezifische Endoribonucleaseaktivität, die die Target-Sense-mRNA autokatalytisch spaltet. Eine vollständige Beschreibung der Funktion von Ribozymen ist bei Haseloff und Gerlach (1988) dargestellt und in der internationalen Patentanmeldung WO 89/05852 enthalten. Die vorliegende Erfindung erstreckt sich auf Ribozyme, die auf eine Sense-mRNA mit Codierung für ein hierin beschriebenes Epoxygenasepolypeptid als Ziel ausgerichtet sind, wodurch sie mit der Sense-mRNA hybridisieren und diese spalten, so dass sie nicht länger zur Translation unter Synthese eines funktionalen Polypeptidprodukts fähig ist.

**[0143]** Gemäß dieser Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung ein Ribozym- oder Antisense-Molekül bereit, das eine Sequenz fortlaufender Nucleotidbasen umfasst, die zur Bildung eines über Wasserstoffbrücken gebundenen Komplexes mit einer Sense-mRNA mit Codierung für eine hierin beschriebene Epoxygenase unter Verringerung der Translation der mRNA fähig sind. Obwohl die bevorzugten Antisense- und/oder Ribozymmoleküle mit mindestens etwa 10 bis 20 Nucleotiden des Zielmoleküls hybridisieren, erstreckt sich die vorliegende Erfindung auf Moleküle mit der Fähigkeit zur Hybridisierung mit einer Strecke von mindestens etwa 50–100 Nucleotidbasen oder ein Molekül mit der Fähigkeit zur Hybridisierung mit einer Epoxygenase-mRNA voller Länge oder im wesentlichen voller Länge.

**[0144]** Es ist einschlägig klar, dass bestimmte Modifikationen, die unter anderem Nucleotidsubstitutionen umfassen, an den Antisense- und/oder Ribozymmolekülen der vorliegenden Erfindung durchgeführt werden können, ohne die Wirksamkeit der Moleküle zur Hemmung der Expression des Epoxygenasegens zu zerstören. Vom Umfang der vorliegenden Erfindung werden daher beliebige Nucleotidsequenzvarianten, -homologa, -analoge oder Fragmente des Gens mit Codierung hierfür umfasst, wobei die einzige Bedingung darin besteht, dass die Nucleotidsequenzvariante, wenn sie transkribiert wird, ein Antisense- und/oder Ribozymmolekül ergibt, das zur Hybridisierung mit dem Sense-mRNA-Molekül fähig ist.

**[0145]** Die vorliegende Erfindung erstreckt sich auf Genkonstrukte; die zur Erleichterung der Expression eines Sense-Moleküls, Antisense-Moleküls, Ribozymmoleküls oder Cosuppressionsmoleküls, die zur Änderung der Konzentrationsmenge von Epoxyfettsäuren in einer Zelle fähig sind, gestaltet sind.

**[0146]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das Sense-Molekül, Antisense-Molekül, Ribozymmolekül, Cosuppressionsmolekül oder Genzielausrichtungsmolekül, das zur Änderung der Epoxyfettsäurekomposition einer von einer Pflanze oder einem anderen Organismus abgeleiteten Zelle fähig ist, eine Nucleotidsequenz, die in einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1, 3, 5, 19 oder 20 und noch günstiger in einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1 oder 3 oder 5 und noch besser in SEQ ID NO: 1 angegeben ist, oder einen komplementären Strang, ein Homologon, Analogon oder Derivat hierfür.

**[0147]** Dem Fachmann ist auch klar, dass die Expression eines Sense-, Antisense-, Ribozym- oder Cosuppressionsmoleküls erfordern kann, dass das Nucleinsäuremolekül der Erfindung in funktioneller Verknüpfung mit einer Promotorsequenz platziert ist. Die Wahl eines Promotors für den vorliegenden Zweck kann in Abhängigkeit vom erforderlichen Expressionsgrad des Sense-Moleküls und/oder der Art, von der die Wirtszelle abgeleitet ist, und/oder der Gewebespezifität oder Entwicklungsspezifität der Expression des Sense-Moleküls, die erforderlich ist, variieren.

**[0148]** Ein Verweis hierin auf einen "Promotor" ist in dem breitesten Zusammenhang hierfür zu sehen und er umfasst die transkriptionsregulatorischen Sequenzen eines klassischen eukaryotischen genomischen Gens, die die TATA-Box, die für einen genauen Transkriptionsstart erforderlich ist, mit einer oder ohne eine CCAAT-Boxsequenz und weitere regulatorische Elemente (d.h. strangaufwärtige Aktivierungssequenzen, Enhancer und Silencer), die die Genexpression als Reaktion auf Entwicklungsreize und/oder äußere Reize oder in gewebespezifischer Weise ändern, umfassen. Im Zusammenhang der Erfindung umfasst der Ausdruck "Promotor" auch die transkriptionsregulatorischen Sequenzen eines klassischen prokaryotischen Gens, wobei sie in diesem Fall eine -35-Boxsequenz und/oder transkriptionsregulatorische Sequenzen einer -10-Box umfassen können.

**[0149]** Im vorliegenden Zusammenhang wird der Ausdruck "Promotor" auch zur Beschreibung eines synthetischen oder Fusionsmoleküls oder eines Derivats, das die Expression des Sense-Moleküls in einer Zelle verleiht, aktiviert oder verstärkt, verwendet. Bevorzugte Promotoren können zusätzliche Kopien von einem oder mehreren spezifischen regulatorischen Elementen zur weiteren Verstärkung der Expression des Sense-Moleküls und/oder zur Änderung der räumlichen Expression und/oder zeitlichen Expression des Sense-Moleküls enthalten. Beispielsweise können auf Kupfer ansprechende regulatorische Elemente angrenzend zu einer heterologen Promotorsequenz, die die Expression eines Sense-Moleküls antreibt, platziert werden, um dieser eine durch Kupfer induzierbare Expression zu verleihen.

**[0150]** Das Setzen eines Sense-, Antisense-, Ribozym- oder Cosuppressionsmoleküls unter die regulatorische Kontrolle einer Promotorsequenz bedeutet die Positionierung des Moleküls derart, dass die Expression durch die Promotorsequenz kontrolliert wird. Ein Promotor ist üblicherweise, jedoch nicht zwangsläufig, strangaufwärts oder 5' eines Nucleinsäuremoleküls, das er reguliert, positioniert. Ferner sind die regulatorischen Elemente, die einen Promotor umfassen, üblicherweise innerhalb von 2 kb der Transkriptionsstartstelle des Sense-, Antisense-, Ribozym- oder Cosuppressionsmoleküls oder eines diese umfassenden chimären Gens

positioniert. Bei der Konstruktion von heterologen Promotor/Strukturgenkombinationen ist es allgemein bevorzugt, den Promotor in einem Abstand von der Gentranskriptionsstartstelle, der etwa gleich dem Abstand zwischen dem Promotor und dem Gen, das er kontrolliert, in dessen natürlicher Umgebung, d.h. dem Gen, von dem der Promotor abgeleitet ist, ist, zu positionieren. Wie einschlägig bekannt ist, kann eine gewisse Variation dieses Abstands ohne Verlust der Promotorfunktion passend sein. In ähnlicher Weise wird die bevorzugte Positionierung eines regulatorischen Sequenzelements in Bezug auf ein heterologes Gen, das unter dessen Kontrolle gestellt werden soll, durch die Positionierung des Elements in dessen natürlicher Einstellung, d.h. der Gene, von denen es abgeleitet ist, festgelegt. Wiederum kann, wie einschlägig bekannt ist, eine gewisse Variation dieses Abstands ebenfalls erfolgen.

**[0151]** Beispiele für Promotoren, die zur Verwendung in Genkonstrukten der vorliegenden Erfindung geeignet sind, umfassen Promotoren, die von den Genen von Viren, Hefen, Schimmelpilzen, Bakterien, Insekten, Vögeln, Säugern und Pflanzen abgeleitet sind, die zum Funktionieren in isolierten Zellen oder aus diesen regenerierten ganzen Organismen fähig sind. Der Promotor kann die Expression des Sense-, Antisense-, Ribozym- oder Cosuppressionsmoleküls konstitutiv oder differenziert im Hinblick auf das Gewebe, in dem die Expression erfolgt, oder im Hinblick auf das Entwicklungsstadium, in dem die Expression erfolgt, oder als Reaktion auf äußere Reize, wie physiologische Belastungen, Pathogene oder Metallionen, unter anderen regulieren.

**[0152]** Beispiele für Promotoren umfassen den CaMV 35S-Promotor, NOS-Promotor, Octopinsynthese(OCS)-Promotor, Arabidopsis thaliana-SSU-Gen-Promotor, Napin-samenspezifischen-Promotor, P<sub>32</sub>-Promotor, BK5-T-imm-Promotor, lac-Promotor, tac-Promotor, Lambdaphagen- $\lambda_L$ - oder - $\lambda_R$ -Promotor, CMV-Promotor (US-Patent 5 168 062), T7-Promotor, lacUV5-Promotor, SV40-early-Promotor (US-Patent 5 118 627), SV40-late-Promotor (US-Patent 5 118 627), Adenoviruspromotor, Baculovirus-P10- oder Polyhedrinpromotor (US-Patent 5 23 041, 5 242 687, 5 266 317; 4 745 051 und 5 169 784) und dergleichen. Zusätzlich zu den hierin identifizierten spezifischen Promotoren sind zelluläre Promotoren für sogenannte Haushaltsgene verwendbar.

**[0153]** Bevorzugte Promotoren gemäß dieser Ausführungsform sind die Promotoren, die zum Funktionieren in Hefe-, Schimmelpilz- oder Pflanzenzellen fähig sind. Noch günstiger sind zur Verwendung gemäß dieser Ausführungsform verwendbare Promotoren zum Funktionieren in Zellen, die von ölhaltigen Hefen, ölhaltigen Schimmelpilzen oder Ölsamenfeldfruchtpflanzen, wie Flachs, der unter der Marke Linola® (im folgenden als "Linola®-Flachs" bezeichnet) vertrieben wird, Sonnenblume, Saflor, Sojabohne, Leinsamen, Sesam, Baumwollsaamen, Erdnuss, Ölbaum oder Ölpalme, unter anderen, stammen.

**[0154]** Linola® ist eine eingetragene Marke der Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO), Australien.

**[0155]** In einer stärker bevorzugten Ausführungsform kann der Promotor von einem genomischen Klon mit Codierung für ein Epoxygenaseenzym, vorzugsweise von den Genomgenäquivalenten von Epoxygenasegenen, die von Chrysanthemum spp., Crepis spp., die C. palaestina oder andere Crepis sp. umfassen, Euphorbia lagascae oder Vernonia galamensis abgeleitet sind, die hierin angegeben sind, abgeleitet sein.

**[0156]** In einer stärker bevorzugten Ausführungsform kann der Promotor von einem hoch exprimierten Saamen, wie dem Nappingen, unter anderen abgeleitet sein.

**[0157]** Das Genkonstrukt der Erfindung kann ferner eine Terminatorsequenz umfassen und in eine geeignete Wirtszelle eingeführt werden, wo es unter Bildung eines rekombinanten Polypeptidgenprodukts oder alternativ eines Ribozym- oder Antisense-Moleküls exprimiert wird.

**[0158]** Der Ausdruck "Terminator" bezeichnet eine DNA-Sequenz am Ende einer Transkriptionseinheit, die die Termination der Transkription signalisiert. Terminatoren sind 3'-nichttranslatierte DNA-Sequenzen, die ein Polyadenylierungssignal, das die Addition von Polyadenylatsequenzen an das 3'-Ende eines Primärtranskripts ermöglicht, enthalten. Terminatoren, die in Zellen aktiv sind, die von Viren, Hefen, Schimmelpilzen, Bakterien, Insekten, Vögeln, Säugern und Pflanzen abgeleitet sind, sind bekannt und in der Literatur beschrieben. Sie können aus Bakterien, Pilzen, Viren, Tieren und/oder Pflanzen isoliert werden.

**[0159]** Beispiele für Terminatoren, die zur Verwendung in den Genkonstrukten der vorliegenden Erfindung besonders geeignet sind, umfassen den Nopalinsynthase(NOS)genterminator von Agrobacterium tumefaciens, den Terminator des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV)-35S-Gens, den Zein-Genterminator von Zea mays, die Rubisco Small Subunit(SSU)-Genterminatorsequenzen, Subclover Stunt Virus(SCSV)-Gensequenzterminato-



ren, einen beliebigen rho-unabhängigen Terminator von E. coli unter anderen.

**[0160]** Dem Fachmann sind weitere Promotorsequenzen und Terminatorsequenzen, die zur Verwendung bei der Durchführung der Erfindung geeignet sein können, geläufig. Derartige Sequenzen können ohne weiteres ohne übermäßigen Arbeitsaufwand verwendet werden.

**[0161]** Die Genkonstrukte der Erfindung können ferner eine Replikationsursprungssequenz, die zur Replikation in einer spezifischen Zellart, beispielsweise einer Bakterienzelle, erforderlich ist, wenn es erforderlich ist, dass das Genkonstrukt als episomales Genelement (beispielsweise Plasmid- oder Cosmidmolekül) in der Zelle gehalten wird, umfassen.

**[0162]** Bevorzugte Replikationsursprünge umfassen, ohne hierauf beschränkt zu sein, die fl-ori- und colE1-Replikationsursprünge.

**[0163]** Das Genkonstrukt kann ferner ein selektierbares Markergen oder selektierbare Markergene, die in einer Zelle, in der das Genkonstrukt eingeführt ist, funktional sind, umfassen.

**[0164]** Der hier verwendete Ausdruck "selektierbares Markergen" umfasst jedes Gen, das einer Zelle, in der es exprimiert wird, einen Phänotyp verleiht, wobei die Identifizierung und/oder Selektion von Zellen, die mit einem Genkonstrukt der Erfindung oder einem Derivat desselben transfiziert oder transformiert sind, ermöglicht wird.

**[0165]** Hierin betrachtete geeignete selektierbare Markergene umfassen das Ampicillin-Resistenzgen (Amp<sup>r</sup>), Tetracyclin-Resistenzgen (Tc<sup>r</sup>), bakterielle Kanamycin-Resistenzgen (Kan<sup>r</sup>), Phosphinothricin-Resistenzgen, Neomycinphosphotransferasegen (nptII), Hygromycin-Resistenzgen,  $\beta$ -Glucuronidase(GUS)gen, Chloramphenicolacetyltransferase(CAT)gen und Luciferasegen unter anderen.

**[0166]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt eine transfizierte oder transformierte Zelle, ein Gewebe, Organ oder einen ganzen Organismus bereit, die ein rekombinantes Epoxygenasepolypeptid oder ein Ribozym-, Antisense- oder Cosuppressionsmolekül gemäß der Beschreibung hierin oder ein Homologon, Analogon oder Derivat desselben exprimieren.

**[0167]** Vorzugsweise ist das isolierte Nucleinsäuremolekül in einem Genkonstrukt gemäß der Beschreibung hierin enthalten. Das Genkonstrukt der vorliegenden Erfindung kann in eine Zelle durch verschiedene, dem Fachmann bekannte Techniken eingeführt werden. Die verwendete Technik kann in Abhängigkeit von den bekannten erfolgreichen Techniken für den speziellen Organismus variieren.

**[0168]** Mittel zur Einführung von rekombinanter DNA in Bakterienzellen, Hefezellen oder Pflanzen-, Insekten-, Pilze- (einschließlich Schimmelpilze), Vögel- oder Säugergewebe oder -zellen umfassen, ohne hierauf beschränkt zu sein, die Transformation unter Verwendung von CaCl<sub>2</sub> und Variationen derselben, insbesondere das Verfahren gemäß der Beschreibung von Hanahan (1983), eine direkte DNA-Aufnahme in Protoplasten (Krens et al., 1982; Paszkowski et al., 1984), die PEG-vermittelte Aufnahme in Protoplasten (Armstrong et al., 1990), Mikroteilchenbeschuss, Elektroporation (Fromm et al., 1985), DNA-Mikroinjektion (Crossway et al., 1986), Mikroteilchenbeschuss von Gewebeexplantaten oder Zellen (Christou et al., 1988; Sanford, 1988), Vakuuminfiltration von Nucleinsäure in Gewebe oder im Falle von Pflanzen T-DNA-vermittelte Übertragung von Agrobacterium in das Pflanzengewebe gemäß der Beschreibung im wesentlichen bei An et al. (1985), Herrera-Estrella et al. (1983a, 1983b, 1985).

**[0169]** Zum Mikroteilchenbeschuss von Zellen werden Mikroteilchen in eine Zelle unter Bildung einer transformierten Zelle getrieben. Jede geeignete ballistische Zelltransformationsmethodik und -vorrichtung kann bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Beispiele für Vorrichtungen und Verfahren sind bei Stomp et al. (US-Patent 5 122 466) und Sanford und Wolf (US-Patent 4 945 050) offenbart. Wenn ballistische Transformationsverfahren verwendet werden, kann das Genkonstrukt ein Plasmid mit der Fähigkeit zur Replikation in der zu transformierenden Zelle enthalten.

**[0170]** Beispiele für zur Verwendung in derartigen Systemen geeignete Mikroteilchen umfassen Goldkugeln von 1 bis 5  $\mu$ m. Das DNA-Konstrukt kann auf dem Mikroteilchen durch jede geeignete Technik, beispielsweise Abscheidung, abgelagert werden.

**[0171]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform, wobei das Genkonstrukt ein "Sense"-Molekül um-

fasst, ist es besonders bevorzugt, wenn das daraus hergestellte rekombinante Epoxygenasepolypeptid enzymatisch aktiv ist.

**[0172]** Alternativ kann, wenn die Zelle von einem mehrzelligen Organismus stammt und relevante Technologie verfügbar ist, ein ganzer Organismus aus der transformierten Zelle entsprechend einschlägig bekannten Verfahren regeneriert werden.

**[0173]** Dem Fachmann sind auch Verfahren zur Transformation, Regeneration und Vermehrung anderer Zellarten, beispielsweise der von Pilzen, geläufig.

**[0174]** Im Falle von Pflanzen kann Pflanzengewebe mit der Fähigkeit zur anschließenden klonalen Vermehrung, ob durch Organogenese oder Embryogenese, mit einem Genkonstrukt der vorliegenden Erfindung transformiert und dadurch eine ganze Pflanze regeneriert werden. Das spezielle gewählte Gewebe variiert in Abhängigkeit von den klonalen Vermehrungssystemen, die für die zu transformierende spezielle Art verfügbar und am besten geeignet ist. Beispiele für Zielgewebe umfassen Blattscheiben, Pollen, Embryos, Kotyledone, Hypokotyle, Megagametophyten, Callusgewebe, bestehendes Meristemgewebe (beispielsweise Apikalmeristem, Achselknospen und Wurzelmeristeme) und induziertes Meristemgewebe (beispielsweise Kotyledonmeristem und Hypokotylmeristem).

**[0175]** Der hier verwendete Ausdruck "Organogenese" bedeutet einen Prozess, wodurch Sprosse und Wurzeln nacheinander aus meristematischen Zentren entwickelt werden.

**[0176]** Der hier verwendete Ausdruck "Embryogenese" bedeutet einen Prozess, wodurch Sprosse und Wurzeln sich zusammen in konzentrierter Weise (nicht aufeinanderfolgend) entweder aus somatischen Zellen oder Gameten entwickeln.

**[0177]** Die regenerierten transformierten Pflanzen können durch eine Vielzahl von Mitteln, wie klonale Fortpflanzung oder klassische Zuchttechniken, vermehrt werden. Beispielsweise kann eine transformierte Pflanze der ersten Generation (oder T1) von sich aus vermehrt werden, wobei eine homozygote Transformante der zweiten Generation (oder T2) erhalten wird und die T2-Pflanzen durch klassische Zuchttechniken weiter vermehrt werden.

**[0178]** Die hierin betrachteten regenerierten transformierten Organismen können eine Vielzahl von Formen einnehmen. Beispielsweise können sie Chimäre von transformierten Zellen und nichttransformierten Zellen, klonale Transformanten (wobei beispielsweise alle transformierten Zellen die Expressionskassette enthalten), Transplantate von transformierten und nichttransformierten Geweben (beispielsweise bei Pflanzen ein auf einen nichttransformierten Schössling transplantierter transformierter Wurzelstock) sein.

**[0179]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt ein Verfahren zur Änderung der Konzentrationsmenge von Epoxyfettsäuren in einer Zelle, einem Gewebe, Organ oder Organismus bereit, wobei das Verfahren die Expression eines Sense-, Antisense-, Ribozym- oder Cosuppressionsmoleküls gemäß der Beschreibung hierin in der Zelle über einen Zeitraum und unter Bedingungen, die so ausreichend sind, dass die Konzentrationsmenge von Epoxyfettsäuren darin erhöht oder verringert wird, umfasst.

**[0180]** In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das vorliegende Verfahren die zusätzliche erste Stufe einer Transformation der Zelle, des Gewebes, Organs oder Organismus mit dem Sense-, Antisense-, Ribozym- oder Cosuppressionsmolekül.

**[0181]** Wie im vorhergehenden diskutiert wurde, kann das isolierte Nucleinsäuremolekül in einem Genkonstrukt enthalten sein.

**[0182]** Gemäß dieser Ausführungsform kann die Zelle, das Organ, Gewebe oder der Organismus, in dem das vorliegende Sense-, Antisense-, Ribozym- oder Cosuppressionsmolekül exprimiert wird, von Bakterien, Hefen, Pilzen (einschließlich Schimmelpilzen), Insekten, Pflanzen, Vögeln oder Säugern stammen.

**[0183]** Da ein rekombinantes Epoxygenasepolypeptid in der regenerierten Transformante sowie ex vivo produziert werden kann, stellt eine alternative bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Produktion eines rekombinanten enzymatisch aktiven Epoxygenasepolypeptids in einer Zelle bereit, wobei das Verfahren die folgenden Stufen umfasst:

(i) Produzieren eines Genkonstrukts, das cDNA- oder genomische Epoxygenasegenesequenz der Erfin-

derung, die funktional unter die Kontrolle eines Promotors mit der Fähigkeit, die Expression der Gensequenz in der Zelle zu bewirken, und optional eines Expression-Enhancerelements gestellt wurde, umfasst;

(ii) Transformieren des Genkonstrukts in die Zelle und

(iii) Selektieren von Transformanten, die die durch die Gensequenz codierte Epoxygenase in hohem Grade exprimieren.

**[0184]** Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten enzymatisch aktiven Epoxygenasepolypeptids in einer transgenen Pflanze bereit, das die folgenden Stufen umfasst:

- (i) Produzieren eines Genkonstrukts, das die cDNA- oder genomische Epoxygenasegensequenz der Erfindung, die funktional unter die Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und optional eines Expression-Enhancerelements gestellt wurde, umfasst, wobei die Gensequenzen auch strangaufwärts einer Transkriptionsterminatorsequenz platziert wurden;
- (ii) Transformieren des Genkonstrukts in eine Zelle oder ein Gewebe der Pflanze und
- (iii) Selektieren von Transformanten, die die durch die Gensequenz codierte Epoxygenase in hohem Grade in Samen exprimieren.

**[0185]** In einer noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Pflanze eine Ölsamenart, die normalerweise bedeutende Mengen Linolsäure produziert, beispielsweise unter anderem Linola®-Flachs, Ölrap, Sonnenblume, Saflor, Sojabohne, Leinsamen, Sesam, Baumwollsaamen, Erdnuss, Olivenbaum oder Ölpalme.

**[0186]** In einer noch stärker bevorzugten Ausführungsform ist die Pflanze eine Ölsamenart, die normalerweise bedeutende Mengen an Linolsäure produziert, beispielsweise unter anderem Linola®-Flachs, Sonnenblume oder Saflor.

**[0187]** Hierin beschriebene enzymatisch aktive rekombinante Epoxygenasen sind zur Produktion von epoxygenierten Fettsäuren aus ungesättigten Fettsäuresubstraten besonders verwendbar. Die vorliegende Erfindung betrachtet insbesondere die Produktion von spezifischen epoxygenierten Fettsäuren in Zellen oder regenerierten transformierten Organismen, die die spezifische epoxygenierte Fettsäure normalerweise nicht produzieren.

**[0188]** Entsprechend stellt ein weiterer Aspekt der Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer epoxygenierten Fettsäure in einer Zelle, einem Gewebe, Organ oder Organismus bereit, wobei das Verfahren die Inkubation einer Zelle, eines Gewebes, Organs oder Organismus, die eine enzymatisch aktive rekombinante Epoxygenase der vorliegenden Erfindung exprimieren, mit einem Fettsäuresubstratmolekül, vorzugsweise einem ungesättigten Fettsäuresubstratmolekül über einen Zeitraum und unter Bedingungen, die so ausreichend sind, dass mindestens eine Kohlenstoffbindung des Substrats in eine Epoxygruppe umgewandelt wird, umfasst.

**[0189]** In einer alternativen Ausführungsform umfasst das vorliegende Verfahren ferner die zusätzliche erste Stufe der Transformation oder Transfektion der Zelle, des Gewebes, Organs oder Organismus mit einem Nucleinsäuremolekül, das für die rekombinante Epoxygenase oder ein Homologon, Analogon oder Derivat derselben gemäß der vorhergehenden Beschreibung hierin codiert. Wie im vorhergehenden diskutiert, kann das isolierte Nucleinsäuremolekül in einem Genkonstrukt enthalten sein.

**[0190]** Gemäß dieser Ausführungsform stammt die Zelle, das Organ, Gewebe oder der Organismus, in dem die vorliegende Epoxygenase exprimiert wird, von einer Bakterie, Hefe, einem Pilz (einschließlich einem Schimmelpilz), einem Insekt, einer Pflanze, einem Vogel oder einem Säuger. Noch besser stammt die Zelle, das Organ, Gewebe oder der Organismus von einer Hefe, einer Pflanze oder einem Pilz, noch besser von einer ölhaltigen Hefe oder Pflanze oder einem ölhaltigen Pilz oder von einer Ölsamenpflanze, die die rekombinante Epoxygenase der Erfindung normalerweise nicht exprimiert.

**[0191]** Von den hierin betrachteten, wirtschaftlich wichtigsten Ölsamenpflanzen sind Genotypen von Flachs, Sonnenblume, Mais und Saflor mit hohem Linolgehalt bevorzugte Ziele. Sojabohne und Raps sind alternative Ziele, jedoch für eine maximale Epoxyfettsäuresynthese wegen ihrer geringeren Konzentrationen an Linolsäuresubstrat und des Vorhandenseins einer aktiven p15-Desaturase, die mit der Epoxygenase um das Linolsäuresubstrat konkurriert, weniger geeignet.

**[0192]** Eine alternative Ausführungsform ist die Transformation von Linola® (= Flachs mit geringem Linolsäuregehalt) mit der Epoxygenase der Erfindung. Linola®-Flachs enthält normalerweise um 70 % Linolsäure, wobei sehr wenig davon (<2 %) durch p15-Desaturase anschließend in Linolensäure umgewandelt wird (Green,

1986).

**[0193]** Hierin betrachtete bevorzugte ungesättigte Fettsäuresubstrate umfassen, ohne hierauf beschränkt zu sein, Palmitoleinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure und Arachidonsäure unter anderen.

**[0194]** Bei Pflanzenarten, die von Natur aus hohe Konzentrationen an Vernolsäure enthalten, kann die p12-Epoxygenase darin sehr effizient zur Epoxidierung von Linolsäure sein. Infolgedessen betrachtet die vorliegende Erfindung insbesondere die Expression von rekombinanter p12-Epoxygenase, die von *Euphorbia lagascae*, *Vernonia* spp. und *Crepis* spp. stammt, in hohen Graden in transgenen Ölsamen während der Samensynthese, wobei hohe Konzentrationen von Vernolsäure darin produziert werden.

**[0195]** Entsprechend ist Linolsäure ein besonders bevorzugtes Substrat gemäß dieser Ausführungsform der Erfindung. Weitere Substrate sind nicht ausgeschlossen.

**[0196]** Die Produkte der im vorhergehenden aufgelisteten Substratmoleküle werden durch den Fachmann ohne übermäßigen Arbeitsaufwand ohne weiteres bestimmt. Besonders bevorzugte Fettsäuren, die gemäß der vorliegenden Erfindung produziert werden, umfassen unter anderen 12,13-Epoxy-9-octadecensäure (Vernolsäure) und 12,13-Epoxy-9,15-octadecadiensäure.

**[0197]** Die Bedingungen zur Inkubation von Zellen, Organen, Geweben oder Organismen, die die rekombinante Epoxygenase exprimieren, in Gegenwart des Substratmoleküls variieren zumindest in Abhängigkeit von der Aufnahme des Substrats in die Zelle, das Gewebe, Organ oder den Organismus und der Affinität der Epoxygenase für das Substratmolekül in der speziellen gewählten Umgebung. Optimale Bedingungen können durch den Fachmann auf dem relevanten Gebiet ohne weiteres bestimmt werden.

**[0198]** Die vorliegende Erfindung erstreckt sich klar auf das isolierte Öl, das Epoxyfettsäuren enthält, und/oder die isolierte Epoxyfettsäure selbst, die gemäß der Beschreibung hierin produziert wurde, und etwaige, davon hergeleitete Produkte, beispielsweise unter anderem Beschichtungen, Harze, Klebstoffe, Kunststoffe, grenzflächenaktive Mittel und Gleitmittel.

**[0199]** Die Erfinder zeigten ferner, dass die Monooxygenasen gemischter Funktion (MMO), die katalytische Funktionen wie Desaturierung, Acetylierung, Hydroxylierung und/oder Epoxygenierung durchführen, eine Familie von Genen bilden, die beträchtliche Nucleotid- und Aminosäuresequenzähnlichkeit teilen. Beispielsweise sind die Desaturase-, Acetylenase-, Hydroxylase- und/oder Epoxygenaseenzyme, die auf Substratmoleküle einer ähnlichen Kettenlänge und Position etwaiger Kohlenstoffdoppelbindungen (falls vorhanden) wirken, miteinander enger verwandt als mit auf andere Substrate wirkenden Enzymen und sie können als "Familie" betrachtet werden.

**[0200]** Ohne an eine Theorie oder Wirkungsweise gebunden zu sein, hat die Sequenzähnlichkeit zwischen den Mitgliedern einer Genfamilie ihre Basis auf der Identität der beteiligten Substanz und der biochemischen Ähnlichkeit der Reaktionsereignisse, die an der Zielkohlenstoffbindung während der Modifizierungsreaktion auftreten, was nahe legt, dass divergierende Sequenzen in einer Familie katalytische Determinanten oder mindestens einen funktionalen Teil derselben, der zu den spezifischen katalytischen Eigenschaften der Familienmitglieder beiträgt, umfassen können.

**[0201]** Ein Beispiel für eine Familie sind die Desaturase-, Acetylenase-, Hydroxylase- und/oder Epoxygenaseenzyme, die Desaturierung, Acetylierung, Hydroxylierung und/oder Epoxygenierung von jeweils der p12-Position von Linolsäure katalysieren (im folgenden als die "C18-p12-MMO-Familie" bezeichnet). Die Erfinder der vorliegenden Erfindung verglichen die Nucleotid- und Aminosäuresequenzen von Mitgliedern der C18-p12-MMO-Familie zur Bestimmung der divergierenden Regionen derselben, die potentiell die Determinanten alternativer katalytischer Funktionen an der p12-Position (im folgenden als "vermutliche katalytische Determinanten" bezeichnet) umfassen.

**[0202]** Des weiteren wird das Vorhandensein derartiger Familien von fettsäuremodifizierenden MMOs im Hinblick auf eine andere Fettsäurekettenlänge und andere Doppelbindungspositionen einer Fettsäure betrachtet. Beispielsweise wird die C18-p15-Desaturase als zu einer Familie verwandter Enzyme mit der Fähigkeit zur Desaturierung, Acetylierung, Hydroxylierung und/oder Epoxydation der p15-Position in C18-Fettsäuresubstraten, der C18-p15-MMO-Familie, gehörend betrachtet.

**[0203]** Durch die Produktion synthetischer Gene, in denen diese katalytischen Determinanten ausgetauscht

wurden (als "Domain Swapping" bezeichnet), ist es möglich, Gene mit Codierung für eine katalytische Funktion in solche mit Codierung für alternative katalytische Funktionen umzuwandeln. Beispielsweise kann die p12-Epoxygenase der vorliegenden Erfindung in eine p12-Acetylenase durch Austausch von Teilen von deren C-terminalen und N-terminalen Sequenzen durch die äquivalenten Domänen von der p12-Acetylenase von *Crepis alpina* umgewandelt werden. In ähnlicher Weise kann das umgekehrte Domain Swapping ebenfalls durchgeführt werden.

**[0204]** Als weitere Verfeinerung können derartige Änderungen der katalytischen Funktion in ähnlicher Weise durch die Durchführung spezifischer Änderungen (beispielsweise Addition, Substitution oder Deletion) an nur den Aminosäuren innerhalb jeder Domäne, die zur Bestimmung der relevanten katalytischen Funktion entscheidend wichtig sind, (beispielsweise durch positionsspezifische Mutagenese) bewirkt werden.

**[0205]** Entsprechend betrachtet ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ein synthetisches Fettsäuregen, das eine von einem Epoxygenasegen gemäß der Beschreibung hierin abgeleitete Nucleotidsequenz umfasst, wobei das synthetische Fettsäuregen für ein Polypeptid mit Epoxygenase- oder Acetylenase- oder Hydroxylase- oder Desaturaseaktivität codiert, wobei das Polypeptid entweder eine Aminosäuresequenz umfasst, die von einem natürlich vorkommenden Epoxygenase- oder Acetylenase- oder Hydroxylase- oder Desaturaseenzym verschieden ist, oder das Polypeptid katalytische Eigenschaften zeigt, die von einem natürlich vorkommenden Epoxygenase- oder Acetylenase- oder Hydroxylase- oder Desaturaseenzym verschieden sind, oder das Polypeptid eine Sequenz von Aminosäuren umfasst, die zu mindestens etwa 60 % identisch mit einem Teil von SEQ ID NO: 2 oder 4 oder 6 oder einem Homologen, Analogon oder Derivat des Teils ist.

**[0206]** Vorzugsweise ist das synthetische Fettsäuregen der Erfindung von einem p12-Epoxygenasegen abgeleitet.

**[0207]** In einer Ausführungsform codiert das synthetische Fettsäuregen der Erfindung für ein Fusionspolypeptid, in dem die N-terminalen und/oder C-terminalen Aminosäuren von einer der Sequenzen SEQ ID NO: 2 oder 4 oder 6 in-frame durch Aminosäuresequenzen eines unterschiedlichen Elements der gleichen Familie ersetzt sind.

**[0208]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die N-terminalen und/oder C-terminalen Aminosäuren von SEQ ID NO: 2 oder 4 oder 6 durch die entsprechenden Regionen der in **Fig. 2** angegebenen Acetylenase-, Desaturase- oder Hydroxylasepolypeptide ersetzt. Noch günstiger sind mindestens etwa 30 Aminosäurereste von den N-terminalen und/oder C-terminalen Regionen von einer der Sequenzen SEQ ID NO: 2 oder 4 oder 6 in-frame durch die entsprechenden Regionen der in **Fig. 2** angegebenen Acetylenase-, Desaturase- oder Hydroxylasepolypeptide ersetzt.

**[0209]** In einer alternativen Ausführungsform codiert das synthetische Fettsäuregen der Erfindung für ein Fusionspolypeptid, in dem die N-terminalen und/oder C-terminalen Aminosäuren einer Fettsäure-Acetylenase oder Fettsäure-Hydroxylase oder Fettsäure-Desaturase in-frame durch die N-terminale und/oder C-terminale Region von einer der Sequenzen SEQ ID NO: 2 oder 4 oder 6 ersetzt sind.

**[0210]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die N-terminalen und/oder C-terminalen Aminosäuren einer Fettsäure-Acetylenase oder Fettsäure-Hydroxylase oder Fettsäure-Desaturase in-frame durch die N-terminale und/oder C-terminale Region von einer der Sequenzen SEQ ID NO: 2 oder 4 oder 6 ersetzt. Noch besser ist die Fettsäure-Acetylenase oder Fettsäure-Hydroxylase oder Fettsäure-Desaturase aus der in **Fig. 2** angegebenen Liste ausgewählt.

**[0211]** Noch besser sind mindestens etwa 30 Aminosäurereste aus den N-terminalen und/oder C-terminalen Regionen einer Fettsäure-Acetylenase oder Fettsäure-Hydroxylase oder Fettsäure-Desaturase in-frame durch die N-terminale und/oder C-terminale Region von einer der Sequenzen SEQ ID NO: 2 oder 4 oder 6 ersetzt.

**[0212]** Entsprechend erstreckt sich die vorliegende Erfindung auf beliebige Varianten der hierin angegebenen Epoxygenaseenzyme, wobei die Varianten von einem Epoxygenasepolypeptid gemäß der Beschreibung hierin abgeleitet sind und belegbare Acetylenase- oder Hydroxylase- oder Desaturaseaktivität zeigen und entweder eine Aminosäuresequenz zeigen, die von einem natürlich vorkommenden Acetylenase- oder Hydroxylase- oder Desaturaseenzym verschieden ist, oder katalytische Eigenschaften zeigen, die von einem natürlich vorkommenden Acetylenase- oder Hydroxylase- oder Desaturaseenzym verschieden sind, oder eine Aminosäuresequenz umfassen, die zu mindestens etwa 60 % identisch mit einer von SEQ ID NO: 2 oder 4 oder 6 ist.

**[0213]** In Bezug auf andere Aspekte der Erfindung können die hierin beschriebenen Varianten als rekombinante Polypeptide oder in transgenen Organismen produziert werden, sobald die vorliegenden synthetischen Gene in eine geeignete Wirtszelle eingeführt sind und darin exprimiert werden.

**[0214]** Die hierin beschriebenen rekombinanten Polypeptide oder ein Homologon, Analogon oder Derivat derselben können auch immunologisch aktive Moleküle sein.

**[0215]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ergibt ein immunologisch interaktives Molekül, das zur Bindung an ein rekombinantes Epoxygenasepolypeptid der Erfindung fähig ist.

**[0216]** Vorzugsweise umfasst das rekombinante Epoxygenasepolypeptid, an das das immunologisch interaktive Molekül binden kann, eine Aminosäuresequenz, die in einer der Sequenzen SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 angegeben ist, oder ein Homologon, Analogon oder Derivat derselben.

**[0217]** In einer Ausführungsform ist das immunologisch interaktive Molekül ein Antikörpermolekül. Das Antikörpermolekül kann monoklonal oder polyklonal sein. Monoklonale oder polyklonale Antikörper können aus natürlich vorkommenden Antikörpern gegenüber einem Epitop oder einem Peptidfragment oder einem synthetischen Epoxygenasepeptid, das von einem rekombinanten Genprodukt abgeleitet ist, gewählt werden oder spezifisch gegen eine rekombinante Epoxygenase oder ein Homologon, Analogon oder Derivat derselben gebildet werden.

**[0218]** Sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper sind durch Immunisierung mit einem geeigneten Genprodukt oder Epitop oder Peptidfragment eines Genprodukts erhältlich. Alternativ können Fragmente von Antikörpern, beispielsweise Fab-Fragmente, verwendet werden. Die vorliegende Erfindung erstreckt sich auf rekombinante und synthetische Antikörper und Antikörperhybride. Als "synthetischer Antikörper" wird hierin einer betrachtet, der Fragmente und Hybride von Antikörpern umfasst.

**[0219]** Die hierin betrachteten Antikörper können zur Identifizierung von Gensequenzen, die verwandte Epoxygenasepolypeptide, die durch die hierin beschriebenen Ausführungsformen umfasst werden, exprimieren, verwendet werden.

**[0220]** Die einzige Bedingung zur erfolgreichen Detektion einer verwandten Epoxygenasegensequenz besteht darin, dass die Gensequenz exprimiert wird, wobei mindestens ein durch das Antikörpermolekül erkanntes Epitop produziert wird. Vorzugsweise wird zum Zweck, dass eine Expression zum Ermöglichen einer Detektion erhalten wird, die verwandte Gensequenz funktional hinter einer Promotorsequenz, beispielsweise dem bakteriellen lac-Promotor, platziert. Gemäß dieser bevorzugten Ausführungsform werden die Antikörper zur Detektion des Vorhandenseins eines Plasmids oder Bakteriophagen, der die verwandte Epoxygenase exprimiert, verwendet. Entsprechend sind die Antikörpermoleküle bei der Reinigung des Plasmids oder Bakteriophagen, der die verwandte Epoxygenase exprimiert, verwendbar.

**[0221]** Die vorliegenden Antikörpermoleküle können auch zur Reinigung der rekombinanten Epoxygenase der Erfindung oder eines natürlich vorkommenden Äquivalents oder eines Homologons, Analogons oder Derivats derselben verwendet werden.

**[0222]** Die vorliegende Erfindung wird ferner unter Bezug auf die folgenden nichtbeschränkenden Beispiele beschrieben.

#### BEISPIEL 1

##### Charakterisierung von Epoxyfettsäuren in *Euphorbia lagascae* und *Crepis* spp.

**[0223]** Samen der Wildart von *Euphorbia lagascae* und von verschiedenen *Crepis*-Arten wurden durch Gasflüssigchromatographie auf das Vorhandensein von Epoxyfettsäuren gescreent.

**[0224]** Wie in Tabelle 3 angegeben ist, enthält *Euphorbia lagascae* sehr hohe Konzentrationen der Epoxyfettsäure Vernolsäure in deren Samenöl. Für Samen von *Crepis palaestina* wurde gezeigt, dass sie 61,4 Gew.-% Vernolsäure und 0,75 Gew.-% an der Acetylenfettsäure Crepeninsäure von den gesamten Fettsäuren enthalten (Tabelle 3).

TABELLE 3

Fettsäurezusammensetzung von Lipiden, die aus Samen von *Crepis alpina*, *Crepis palaestina* und *Euphorbia lagascae* stammen

Fettsäure	Relative Verteilung (Gew.-%) <sup>a</sup>		
	<i>Crepis alpina</i>	<i>Crepis palaestina</i>	<i>Euphorbia lagascae</i>
Palmitinsäure	3,9	5,1	4,3
Stearinsäure	1,3	2,3	1,8
Ölsäure	1,8	6,3	22,0
Linolsäure	14,0	23,0	10,0
Crepininsäure	75,0	0,7	0
Vernolsäure	0	61,4	58,0
Andere	4,0	1,2	3,9

<sup>a</sup> Berechnet aus den Flächenprozent der gesamten integrierten Peakflächen bei der gasflüssigchromatographischen Bestimmung von Methylesterderivaten der Samenlipide

## BEISPIEL 2

Biochemische Charakterisierung von Linoleat-p12-Epoxygenasen in *Euphorbia lagascae* und *Crepis palaestina*

**[0225]** Das Enzym Linoleat-p12-Epoxygenase synthetisiert Vernolsäure aus Linolsäure. Linoleat-p12-Epoxygenasen, die von *Euphorbia lagascae* und *Crepis palaestina* stammen, sind in den Mikrosomen lokalisiert. Die Enzyme von diesen Arten können zumindest in Membran(mikrosomalen)fraktionen, die aus sich entwickelnden Samen hergestellt wurden, aktiv bleiben.

**[0226]** Membranzubereitungen von *Euphorbia lagascae* und Tests von deren Epoxygenaseaktivitäten wurden gemäß der Beschreibung von Bafor et al. (1993) mit Inkubationen, die NADPH enthalten, falls nicht anders in Tabelle 4 angegeben, durchgeführt. Lipidextraktion, -abtrennung und -methylierung sowie GLC- und Radio-GLC-Trennung wurden im wesentlichen gemäß der Beschreibung bei Kohn et al. (1994) und Bafor et al. (1993) durchgeführt.

**[0227]** Membranzubereitungen von *Crepis alpina* und *Crepis palaestina* wurden wie im folgenden erhalten. Pflanzen von *Crepis alpina* und *Crepis palaestina* wurden in Treibhäusern gezüchtet und Samen wurden im mittleren Entwicklungsstadium (17–20 Tage nach dem Blühen) geerntet. Kotyledone wurden aus deren Samenhüllen gedrückt und mit Mörser und Pistill in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2, der 0,33 M Saccharose, 4 mM NADH, 2 mM CoASH, 1 mg Rinderserumalbumin/ml und 4000 Einheiten Katalase/ml enthielt, homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min mit 18 000 × g zentrifugiert und der gebildete Überstand wurde 60 min mit 150 000 × g zentrifugiert, wobei ein mikrosomales Pellet erhalten wurde.

**[0228]** Standard-Desaturase-, -Acetylenase- und -Epoxygenaseassays mit Mikrosomenmembranen von *Crepis*-Arten wurden bei 25 °C mit Mikrosomenzubereitungen, die äquivalent mit 0,2 mg Mikrosomenprotein waren, die in frischem Homogenisierungspuffer und 10 nmol von entweder [1-<sup>14</sup>C]18:1-CoA oder [1-<sup>14</sup>C]18:2-CoA (spezifische Aktivität 85 000 dpm/nmol) in einem Gesamtvolumen von 360 µl suspendiert wurden, durchgeführt. Wenn NADPH als Coreduktionsmittel verwendet wurde, wurden die Membranen in Homogenisierungspuffer, in dem NADH durch NADPH ersetzt war, resuspendiert.

**[0229]** Die biochemische Charakterisierung der mikrosomalen Linoleat-p12-Epoxygenase, die von *Euphorbia lagascae* und *Crepis palaestina* stammte, wurde durchgeführt und die erhaltenen Daten wurden mit den biochemischen Eigenschaften von Oleat-p12-Desaturase- und Linoleat-p12-Acetylenaseenzymen, die von Mikrosomenzubereitungen von *Crepis alpina* stammten, verglichen (Tabelle 4).



**[0230]** Wie in Tabelle 4 gezeigt ist, zeigt die Linoleat-p12-Epoxygenase von *Crepis palaestina* ähnlich biochemische Merkmale wie die Linoleat-p12-Acetylenase und Oleat-p12-Desaturase von *Crepis alpina* insofern, als alle drei Enzyme  $O_2$  erfordern, gleich gut mit entweder NADH oder NADPH als Coreduktionsmitteln wirken und durch Cyanid, jedoch nicht durch Kohlenmonoxid gehemmt werden. Ferner wird keines dieser Enzyme durch monoklonale Antikörper gegenüber Cytochrom-P450-Reduktase gehemmt.

**[0231]** Die Daten in Tabelle 4 legen nahe, dass die Linoleat-p12-Epoxygenase von *Crepis palaestina* zur gleichen Enzymklasse wie die mikrosomale Oleat-p12-Desaturase und Linoleat-p12-Acetylenase von *Crepis alpina* gehört.

**[0232]** Im Gegensatz dazu erfordert die Linoleat-p12-Epoxygenase von *Euphorbia lagascae* NADPH als Coreduktionsmittel, sie wird durch Cyanid nicht gehemmt, wird jedoch durch Kohlenmonoxid gehemmt (Tabelle 4). Ferner ermittelten die Erfinder, dass die Linoleat-p12-Epoxygenase von *Euphorbia lagascae* durch monoklonale Antikörper, die gegen eine Cytochrom-P450-Reduktaseenzym gebildet wurden, gehemmt wird. Diese Daten legen nahe, dass die Linoleat-p12-Epoxygenase von *Euphorbia lagascae* zur Cytochrom-P450-Proteinklasse gehört und daher biochemisch nicht mit der Linoleat-p12-Epoxygenase von *Crepis palaestina* verwandt ist.

TABELLE 4

Vergleich der biochemischen Eigenschaften von Epoxygenasen, Acetylenasen und Desaturasen, die von *Crepis* spp. und *Euphorbia lagascae* stammen

Behandlung	Enzymaktivität (% der Kontrolle)			
	Oleat-p12-Desaturase von <i>C. alpina</i>	Linoleat-p12-Acetylenase von <i>C. alpina</i>	Linoleat-p12-Epoxygenase von <i>C. palaestina</i>	Linoleat-p12-Epoxygenase von <i>E. lagascae</i>
Kohlenmonoxid	85	84	88	3
Anti-P450-Reduktase-Antikörper ( $C_{5}A_5$ )	96	91	94	33
KCN	16	0	35	92
minus NADH plus NADPH	95	73	94	100 (Kontrolle)
minus NADPH plus NADH	100 (Kontrolle)	100 (Kontrolle)	100 (Kontrolle)	11

Strategie zur Klonierung von Epoxygenasegenen von *Crepis palaestina*

**[0233]** Die Klonierung der Epoxygenasegene von *Crepis palaestina* beruhte auf den Eigenschaften der in den vorhergehenden Beispielen beschriebenen Enzyme von *C. palaestina* und *C. alpina*.

**[0234]** Insbesondere wurde Poly(A)+RNA aus sich entwickelnden Samen von *Crepis palaestina* unter Verwendung eines QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotechnology) isoliert und zur Synthese einer Oligosaccharid-d(T)-primed doppelsträngigen cDNA verwendet. Die doppelsträngige cDNA wurde an EcoRI/NotI-Adaptoren (Pharmacia Biotechnology) ligiert und eine cDNA-Bibliothek wurde unter Verwendung des ZAP-cDNA-Gigapack Cloning Kit (Stratagene) konstruiert.

**[0235]** Einsträngige cDNA wurde aus RNA, die von dem sich entwickelnden Samen von *Crepis alpina* stammte, unter Verwendung von Standardverfahren hergestellt. Ein PCR-Fragment der Bezeichnung D12V (SEQ ID NO: 7) wurde durch Amplifizieren der einsträngigen cDNA unter Verwendung von Primern, die von den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von Monooxygenasen gemischter Funktion von Pflanzen abgeleitet waren, erhalten.

**[0236]** Das D12V-Fragment wurde anschließend statistisch markiert und zum Screening der obigen cDNA-Bibliothek von *Crepis palaestina* auf Hybond N<sup>+</sup>-Membranfiltern von Amersham gemäß der Vorschrift des Herstellers unter Verwendung von Standardhybridisierungsbedingungen verwendet. Dieser Ansatz führte zur Reinigung eines rekombinanten Bakteriophagen der Bezeichnung Cpal2.

**[0237]** Die Nucleotidsequenz von Cpal2-cDNA wurde bestimmt und ist in SEQ ID NO: 1 angegeben.

**[0238]** Die Cpal2-cDNA schien von voller Länge zu sein. Eine schematische Darstellung eines Expressionsvektors, der die Cpal2-cDNA umfasst, ist in [Fig. 1](#) angegeben. Das darin angegebene Genkonstrukt ist zur Einführung in Pflanzenmaterial zur Produktion einer transgenen Pflanze, die die vorliegende Epoxygenase exprimiert, gestaltet. Der Fachmann erkennt, dass ähnliche Expressionsvektoren ohne übermäßigen Arbeitsaufwand produziert werden können und zur Produktion transgener Pflanzen, die eine der Gensequenzen der vorliegenden Erfindung exprimieren, durch Ersetzen der Cpal2-cDNA durch eine andere Strukturgensequenz verwendet werden können.

**[0239]** Wie in [Fig. 2](#) gezeigt ist, codierte die Nucleotidsequenz der Crep1-cDNA für ein Polypeptid, das zumindest auf der Aminosäureebene mit einem Acetylenaseenzym von *Crepis alpina* nahe verwandt war (Bafor et al. 1997; internationale Patentanmeldung PCT/SE97/00247).

**[0240]** Das 1,4-kb-Insert von pCpal2 wurde sequenziert (SEQ ID NO: 1) und es wurde gezeigt, dass es ein offenes Leseraster umfasst, das für ein Polypeptid einer Länge von 374 Aminosäuren codiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von Cpal2 zeigte 81 % Identität und 92 % Ähnlichkeit mit der p12-Acetylenase von *Crepis alpina* und etwa 60 % Identität und 80 % Ähnlichkeit mit mikrosomalen p12-Desaturaseproteinen von Pflanzen ([Fig. 2](#)). Jedoch umfasste das durch Cpal2 codierte Polypeptid signifikante Unterschiede der Aminosäuresequenz im Vergleich zu Nicht-Epoxygenaseenzymen. Insbesondere weist das Cpal2 eine Deletion von sechs fortlaufenden Aminosäuren in der 5'-terminalen Region im Vergleich zu allen mikrosomalen p12-Desaturasen und eine Deletion von zwei fortlaufenden Aminosäuren in der 3'-terminalen Region im Vergleich zur Crep-1-p12-Acetylenase auf ([Fig. 2](#)).

**[0241]** Obwohl Gene von membrangebundener Fettsäuredesaturase beschränkte Sequenzhomologien zeigen, enthalten sie alle drei Regionen konservierter histidinreicher Motive, die im folgenden angegeben sind:

- (i) His-(Xaa)<sub>3-4</sub>-His,
- (ii) His-(Xaa)<sub>2-3</sub>-His-His und
- (iii) His-(Xaa)<sub>2-3</sub>-His-His,

worin His Histidin bezeichnet, Xaa einen beliebigen natürlich vorkommenden Aminosäurerest, der in Tabelle 1 hierin angegeben ist, bezeichnet, die Einheit (Xaa)<sub>3-4</sub> eine Aminosäuresequenz, die drei oder vier Xaa-Repeats umfasst, bezeichnet und die Einheit (Xaa)<sub>2-3</sub> eine Aminosäuresequenz, die zwei oder drei Xaa-Repeats umfasst, bezeichnet. Es wird vorgeschlagen, dass diese histidinreichen Regionen Teil des aktiven Zentrums des Enzyms sind (Shanklin et al., 1994).

**[0242]** Die durch die Cpal2-cDNA codierte Aminosäuresequenz umfasst drei histidinreiche Motive, die den histidinreichen Motiven der p12-Desaturaseenzyme ähnlich, jedoch nicht mit diesen identisch sind. Diese Daten legen nahe, dass die Cpal2-cDNA für ein Enzym codiert, das zu der Enzymklasse von Monooxygenasen gemischter Funktion gehört.

**[0243]** Die Analyse von Fettsäuren, die in obigem Beispiel 1 dargestellt ist, zeigte, dass Vernolsäure zumindest in den Samen von *Crepis palaestina* vorhanden war. Dieses Enzym kann tatsächlich ausschließlich in den Samen von *C. palaestina* vorhanden sein. Die Expression des Cpal2-Gens wurde unter Verwendung der 3'-nichttranslatierten Region des Cpal2-cDNA-Klons als Hybridisierungsprobe an Northern-Blots von mRNA, die von sich entwickelnden Samen und Blättern von *C. palaestina* stammte, untersucht. Wie in [Fig. 3](#) gezeigt ist, wurde das Cpal2-Gen in sich entwickelnden Samen hoch exprimiert, jedoch konnte keine Expression in Blättern detektiert werden. Diese Daten sind mit dem Enzymaktivitätsprofil von Linoleat-p12-Epoxygenase von *C. palaestina* in diesen Geweben konsistent.

#### BEISPIEL 4

##### Strategie zur Klonierung von Epoxygenasegenen von *Euphorbia lagascae*

**[0244]** Die Klonierung der Epoxygenasegene von *Euphorbia lagascae* beruhte auf den Eigenschaften der Enzyme von *E. lagascae*, die in den vorhergehenden Beispielen beschrieben wurden.

**[0245]** In einem Ansatz, der zur Klonierung von Epoxygenasegenen von *Euphorbia lagascae* unternommen wurde, wurde RNA von unreifen Embryos von *Euphorbia lagascae*, die im Stadium der aktiven Vernolsäuresynthese entnommen wurden, gewonnen und zur Konstruktion einer cDNA-Bibliothek verwendet. Die cDNA-Bibliothek wurde in dem Lambda Zap II-Vektor (Stratagene) gemäß der Beschreibung im vorhergehenden Beispiel konstruiert, mit der Ausnahme, dass die cDNA-Inserts in direktonaler Weise in EcoRI-XhoI-Stellen des in den Lambdavektor eingebetteten Plasmidvektors kloniert wurden.

**[0246]** Der entartete PCR-Primer, der in [Fig. 4](#) angegeben ist, (SEQ ID NO: 18) wurde synthetisiert und zur Amplifikation von Nucleotidsequenzen, die für P450-Enzymsequenzen aus der *Euphorbia lagascae*-cDNA-Bibliothek codieren, verwendet. Für PCR-Amplifikationsreaktionen wurde ein Aliquot von 100 µl der cDNA-Bibliothek mit Phenol:Chloroform [1:1 (V/V)] extrahiert und DNA durch Zugabe von 2 Volumina Ethanol gefällt und schließlich in 10 µl Wasser resuspendiert. Ein Aliquot (1 µl) der resuspendierten DNA wurde als Templat in einer PCR-Amplifikationsreaktion verwendet. PCR-Reaktionen wurden in 10 µl TaqI-Polymerasepuffer, der 200 µM jedes dNTP, 10 pmol des entarteten Primers, 1 pmol von T7-Polymerasepromotorprimer und 0,4 Einheiten TaqI-Polymerase enthielt, durchgeführt.

**[0247]** Die Amplifikationsbedingungen waren 2 min bei 94 °C und fünf Zyklen, wobei jeder Zyklus 1 min bei 48 °C und anschließend 2 min bei 72 °C und anschließend 30 s bei 93 °C umfasste, dann 28 Zyklen, wobei jeder Zyklus 30 s bei 55 °C und anschließend 90 s bei 72 °C und anschließend 30 s bei 93 °C umfasste, und schließlich ein Zyklus, der 30 s bei 55 °C und anschließend 10 min bei 72 °C und anschließend 1 min bei 25 °C umfasste.

**[0248]** PCR-Produkte wurden gereinigt und unter Verwendung von EcoRI und XhoI verdaut und dann zur Sequenzcharakterisierung in einen Bluescript-Vektor subkloniert. Es wurde ermittelt, dass einer der PCR-Klone für eine P450-Sequenz codierte und er wurde als Sonde zur Isolierung eines cDNA-Klons voller Länge verwendet. Diese Nucleotidsequenz ist in SEQ ID NO: 19 angegeben. SEQ ID NO: 19 wies Ähnlichkeit mit anderen Mitgliedern der 2C-Familie von P450-Genen auf. Insbesondere zeigt SEQ ID NO: 19 im Durchschnitt 40 % Identität mit den humanen und Ratten-Arachidon-Epoxygenasesequenzen unter Verwendung des BLAST-Programms.

**[0249]** Ferner wurde gezeigt, dass das SEQ ID NO: 19-Transkript in Samen von *Euphorbia lagascae*, jedoch nicht in Wurzeln oder Blättern exprimiert wird ([Fig. 5B](#)). Das SEQ ID NO: 19-Transkript wurde in sich entwickelnden Samen von *Vernonia galamensis*, jedoch nicht in denen von *E. cypris* oder Flachs, zwei Arten, die keine Epoxyfettsäuren produzieren, detektiert ([Fig. 5A und 5B](#)).

**[0250]** In einem alternativen Ansatz, der zur Klonierung von Epoxygenasegenen von *Euphorbia lagascae* unternommen wurde, wurde eine subtraktive Hybridisierungsstrategie zur Isolierung von Genen, die spezifisch in einem Organismus, der hohe Konzentrationsmengen an Epoxyfettsäuren produziert, exprimiert werden, verwendet.

**[0251]** Insbesondere wurde das in [Fig. 6](#) beschriebene subtraktive Hybridisierungsverfahren zur Isolierung von Epoxygenasen, die spezifisch in *Euphorbia lagascae*, die hohe Konzentrationen der Epoxyfettsäure Vernolsäure produziert, (Beispiel 1) und nicht in der nahe verwandten Art *Euphorbia cyparissus*, die keine Vernolsäure produziert, exprimiert werden, verwendet.

**[0252]** Entsprechend wurde mRNA aus sich entwickelnden Embryos von *Euphorbia lagascae* in einem Stadium, in dem sie aktiv Vernolsäure synthetisieren, isoliert und zur Erzeugung sogenannter "Tester"-cDNA verwendet. Zusätzlich wurde mRNA aus den sich entwickelnden Embryos von *E. cyparissus* (in einem ähnlichen Entwicklungsstadium wie *E. lagascae*) isoliert und zur Erzeugung so genannter "Treiber"-cDNA verwendet.

**[0253]** Das subtraktive Hybridisierungsverfahren führte zu einer Bibliothek, die an Sequenzen, die ausschließlich in *Euphorbia lagascae* exprimiert wurden, angereichert war. Klone aus dieser Bibliothek wurden sequenziert und mindestens zwei Sequenzen wurden auf der Basis der Ähnlichkeit mit anderen P450-Sequenzen in der Datenbank als für P450-Proteine codierend identifiziert. Diese zwei P450-PCR-Klone wurden als Sonden zur Isolierung der entsprechenden cDNA-Klone voller Länge aus der früher angegebenen cDNA-Bibliothek verwendet.

**[0254]** Eine der isolierten P450-cDNAs, die die in SEQ ID NO: 20 angegebene Nucleotidsequenz umfasste, schien in Geweben von *Euphorbia lagascae* exprimiert zu werden (**Fig. 7B**) und keine homologen Transkripte wurden in Samengewebe von *E. cyparissus* oder Flachs, zwei Arten, die keine Epoxyfettsäuren produzieren, detektiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 20 zeigt, dass der cDNA-Klon von voller Länge ist und für ein P450-Enzym codiert. Diese Daten legen nahe, dass die cDNA, für die SEQ ID NO: 20 ein Beispiel ist, für eine Epoxygenase, beispielsweise die Linoleat-p12-Epoxygenase, die Linolsäure in Vernolsäure umwandelt, codieren kann.

## BEISPIEL 5

### Demonstration der Epoxygenaseaktivität

**[0255]** Die Bestätigung, dass die cDNA-Klone, die ein Beispiel für die Erfindung sind, Epoxygenaseaktivitäten codieren, wurde durch Transformation von *Arabidopsis thaliana*, die keine Epoxyfettsäuren, insbesondere Vernolsäure, produziert, mit jedem individuellen Kandidatenklon und die Untersuchung von transformiertem Gewebe auf das Vorhandensein von epoxygenierten Fettsäuren, die sie sonst produzieren würden, oder auf Hydroxyfettsäuren, die durch die Metabolisierung einer epoxygenierten Fettsäure durch die Wirkung endogener Epoxidhydrolasen gebildet werden könnten, (Blee und Schubert, 1990) erhalten.

**[0256]** Die Epoxygenase-cDNA, die SEQ ID NO: 1 umfasste, wurde in das in [Fig. 8](#) angegebene binäre Vektorkonstrukt kloniert. Kurz gesagt wurde die cDNA-Sequenz von dem pCpal2-Plasmid ([Fig. 1](#)) in das binäre Plasmid durch Verdau von pCpal2 mit EcoRI und Auffüllen der Enden des Restriktionsfragments unter Verwendung von T4-DNA-Polymeraseenzym subkloniert. Der binäre Vektor ([Fig. 8](#)) wurde unter Verwendung von BamHI linearisiert und ebenfalls unter Verwendung von T4-DNA-Polymerase an den Enden aufgefüllt. Für die Endauffüllungsreaktionen wurde 1 µg cDNA-Insert oder DNA des linearisierten binären Vektors in 50 µl T4-DNA-Polymerasepuffer (33 mM Tris-Acetat, pH 7,9, 66 mM Kaliumacetat, 10 mM Magnesiumacetat und 5 mM DDT), der mit 100 mM jedes dNTP und 0,1 mg/ml BSA und 3 Einheiten T4-DNA-Polymerase ergänzt war, resuspendiert und während 6 min Inkubation bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen bei 75 °C während 10 min gestoppt. Die glattendig gemachte cDNA und DNA des binären Vektors wurden unter Verwendung von T4-DNA-Ligase und Standardligationsbedingungen gemäß der Empfehlung von Promega ligiert. Klone wurden ausgewählt, in denen die Sequenz SEQ ID NO: 1 hinter dem Napin-Promotor in Sense-Orientierung inseriert war, wodurch die Expression des Epoxygenasepolypeptids möglich war. Das binäre Plasmid, das SEQ ID NO: 1 in Sense-Orientierung funktional unter der Kontrolle des verkürzten Napin-Promotors beherrscht, ist schematisch in [Fig. 9](#) dargestellt.

**[0257]** Das in [Fig. 9](#) angegebene binäre Plasmid wurde unter Verwendung von Elektroporation in den Agrobacterium-Stamm AGL1 transformiert und zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* verwendet. Transgene *A. thaliana*-Pflanzen wurden nach dem Verfahren gemäß der Beschreibung bei Valvekens et al. (1988) und Dolferus et al. (1994) erhalten.

**[0258]** Transgene Pflanzen und nichttransformierte (d.h. Kontroll-) Pflanzen wurden bis zur Reife gezüchtet. Reife Samen jeder Pflanze wurden durch Standardtechniken bezüglich der Fettsäurezusammensetzung analysiert. Primärtransformanten ( $T_0$ )pflanzen wurden festgestellt und T1-Samen wurde von jeder Pflanze geerntet

und bezüglich Fettsäurezusammensetzung durch Gaschromatographie analysiert. Für zwölf  $T_0$ -Pflanzen wurde gezeigt, dass sie Vernolsäure in ihren T1-Samenlipiden mit Konzentrationen im Bereich von 0,9 % bis 15,8 % der gesamten Fettsäuren enthielten, während nichttransformierte Kontrollpflanzen keine Vernolsäure enthielten (Tabelle 5). Die am stärksten exprimierende Pflanzenlinie war Cpal-17, wofür die GLC-Elutionsprofile (durch Analyse gepackter Säulen und Kapillarsäulenanalyse) in **Fig. 10** angegeben sind. Das GLC-Elutionsprofil von einer gepackten Säule für die nichttransformierte Kontrolle ist ebenfalls in **Fig. 10** angegeben.

TABELLE 5

Vernolsäuremengen in transgenen *A. thaliana*-Linien, die SEQ ID NO: 1 exprimieren

$T_0$ -Pflanze Nr.	Vernolsäure (Gewichtsprozent der gesamten Samenfettsäuren)
Cpal-4	1,4
Cpal-5	1,1
Cpal-8	2,7
Cpal-9	0,9
Cpal-13	0,9
Cpal-15	1,1
Cpal-17	15,8
Cpal-21	1,3
Cpal-23	1,4
Cpal-24	1,0
Cpal-25	1,2
Cpal-26	1,1
nichttransformierte Kontrolllinie	0,0

**[0259]** Alternativ oder zusätzlich werden hierin beschriebene vermutliche Fettsäureepoxygenasesequenzen jeweils in *Linum usitatissimum* (Flachs) und *Arabidopsis thaliana* unter der Kontrolle des samenspezifischen Napin-Promotors transformiert. Transgene Flachs- und *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen werden auf das Vorhandensein von Epoxyfettsäuren in Ölen von sich entwickelnden Samen untersucht. Frühere Arbeiten zeigten, dass, wenn Epoxyfettsäuren sich entwickelnden Flachsembryos zugeführt werden, diese in Triglyceride eingebaut werden (Beispiel 10).

**[0260]** Alternativ werden Hefen ebenfalls mit den Epoxygenaseklonen der Erfindung transformiert und auf die Produktion von Epoxyfettsäuren getestet.

## BEISPIEL 6

Massenspektroskopische Bestätigung von Epoxyfettsäuren in  $T_1$ -*Arabidopsis*-Samen, die von primären  $T_0$ -transgenen-Pflanzen hervorgebracht wurden

**[0261]** Gaschromatographie der Methylester, die von Samenlipiden von T1-Samen von Cpal2-transformierten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen präpariert wurden, (Beispiel 5) zeigte das Vorhandensein von zwei zusätzlichen Fettsäuren im Vergleich zu den nichttransformierten Kontrollen. Die erste dieser Verbindungen wies eine Retentionszeit auf, die äquivalent der eines Vernolsäurestandards war. Die zweite Verbindung wies eine längere Retentionszeit auf und wurde vermutlich als 12,13-Epoxy-9,15-octadecadiensäure, ein erwartetes Derivat von Vernolsäure infolge der Desaturierung an der p15-Position durch die endogene p15-Desaturase von *Arabidopsis thaliana*, identifiziert.

**[0262]** Die Bestätigung der exakten Identität der zwei Peaks wurde durch Massenspektroskopie von Diolen, die aus der Epoxyfettsäurefraktion, die von Cpal2-transformierten Pflanzen stammte, präpariert wurden, erhalten. Die Diole wurden weiter in Trimethylsilylether umgewandelt und durch GC-MS DB23 auf einer Quarzglas-kapillarsäule (Hewlett-Packard 5890 II GC gekoppelt an ein Hewlett Packard 5989A MS, das mit Elektronenstoß bei 70eV15 arbeitet) analysiert. Das Gesamtionenchromatogramm zeigte die folgenden zwei Peaks:

- (i) Der als erstes eluierte Peak wies auffallende Ionen der Masse 73, 172, 275 und 299 auf, was anzeigte, dass die Epoxygruppe am C-12 einer C18-Fettsäure positioniert war und dass eine Doppelbindung zwischen der Epoxygruppe und dem Carboxylterminus auftrat. Dieses Massenspektrum war mit dem Spektrum eines Trimethylsilyletherderivats von Diolen, die aus reiner Vernolsäure (12,13-Epoxy-9-octadecensäure) hergestellt wurden, identisch; und
- (ii) der als zweites eluierte Peak wies auffällige Ionen der Masse 73, 171, 273 und 299 auf, was das Vorhandensein von zwei Doppelbindungen und einer Epoxygruppe, die am C-12 einer C18-Fettsäure positioniert ist, anzeigte, was mit dem Massenspektrum für 12,13-Epoxy-9,15-octadecadiensäure konsistent ist.

#### BEISPIEL 7

##### Fettsäureanalyse von Cpal2-transgenen Arabidopsis-Pflanzen

**[0263]** Der T1-Samen, der von transformierten Arabidopsis thaliana-Pflanzen stammte, der den Cpal2-cDNA-Klon unter der Kontrolle des Napin-Promotors exprimierte, wurde keimen gelassen und T1-Pflanzen wurden ausgehend von fünf T<sub>0</sub>-Linien (Nr. 4, 8, 13, 17 & 21 in Tabelle 5) etabliert. Der T2-Samen wurde von jeder T1-Pflanze geerntet und auf die Fettsäurezusammensetzung analysiert. Die Nachkommen der Transformanten Nr. 4, 8, 13 und 21 (Tabelle 5) trennten sich wie erwartet bezüglich des Vorhandenseins von Vernolsäure auf, wobei diese Pflanzen Vernolsäure im Bereich bis zu 3,1 % enthielten (Tabelle 6).

**[0264]** Alle T1-Pflanzen, die Vernolsäure enthielten, (d.h. Epoxy 18:1 in Tabelle 6) enthielten auch 12,13-Epoxy-9,15-octadecadiensäure (d.h. Epoxy 18:2 in Tabelle 6, siehe auch [Fig. 11](#)), was anzeigt, dass ein Teil der durch die Cpal2-Epoxygenase synthetisierten Vernolsäure anschließend durch die endogene p15-Desaturase desaturiert wurde.

TABELLE 6

Fettsäurezusammensetzung von selbstentwickelten Samen, die auf T<sub>1</sub>-Pflanzen hervorgebracht wurden, die von fünf primären Cpal2-Transformanten von *Arabidopsis thaliana* stammten

Pflanze Nr.	Fettsäure										
	Nicht-Epoxyfettsäuren									Epoxyfettsäuren	
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	22:1	18:1	18:2
4-1	8,3	3,9	15,5	23,9	20,6	2,8	16,5	1,7	1,6	-	-
4-2	7,6	4,1	20,3	17,8	18,0	3,4	19,7	1,8	2,0	0,82	0,63
4-3	8,4	4,3	26,0	13,5	16,1	2,8	19,0	1,8	1,6	2,03	0,72
4-4	7,6	4,0	25,2	14,3	16,0	2,8	19,8	2,1	1,7	1,99	0,92
4-5	7,2	3,6	15,6	23,1	19,9	3,1	19,7	1,6	2,1	-	-
4-6	7,0	3,7	19,2	17,8	18,4	3,2	20,3	1,9	2,1	0,87	0,33
4-8	7,4	3,9	16,0	23,6	20,1	3,1	18,7	1,6	1,8	-	-
4-9	7,6	4,0	24,8	13,4	15,9	2,8	20,4	2,3	1,8	2,30	1,07
4-10	7,6	4,2	24,0	13,5	16,2	3,1	20,4	1,9	1,8	1,97	0,83
4-11	7,4	3,9	15,0	23,2	20,4	3,3	18,8	1,7	2,0	-	-
4-12	8,7	4,0	20,7	17,0	17,5	2,6	17,2	1,7	1,5	1,38	0,74
4-13	7,2	4,1	21,9	16,4	17,7	3,2	21,0	1,7	1,9	1,14	0,45
8-1	8,1	3,9	26,1	15,0	16,0	2,6	19,5	2,0	1,6	1,79	0,82
8-3	8,7	4,2	31,6	11,5	14,0	2,2	18,5	1,9	1,4	2,38	1,13
8-4	8,5	4,1	27,2	15,1	16,1	2,5	18,9	1,8	1,4	1,70	0,84
8-5	9,1	4,2	27,7	14,7	16,2	2,4	18,3	1,7	1,5	1,70	0,82
8-6	9,8	4,0	26,0	17,2	17,2	2,3	16,9	1,6	1,2	1,36	0,71
8-7	10,0	3,5	15,2	25,3	22,3	2,3	14,4	1,7	1,7	-	-
8-8	8,4	4,3	32,2	10,7	13,3	2,5	20,3	1,6	1,5	1,92	0,82
8-9	9,8	3,6	15,9	25,3	22,0	2,4	14,5	1,6	1,3	-	-
8-10	7,5	3,9	24,4	15,9	15,8	2,8	20,2	2,2	1,8	1,70	0,82
8-11	7,6	3,8	15,4	23,6	19,8	2,9	19,4	1,5	1,8	-	-
8-12	9,4	3,7	24,2	16,7	16,7	2,2	17,6	0,9	1,2	1,46	0,65
8-13	10,3	4,3	25,3	17,1	17,9	2,2	16,0	1,8	1,3	1,48	0,73
13-1	7,0	4,3	33,3	8,1	11,1	2,7	23,1	1,7	1,6	2,42	1,26
13-2	7,2	4,3	30,4	9,6	12,7	2,8	22,0	1,8	1,6	2,48	1,37
13-3	7,6	3,9	15,6	23,6	19,7	3,0	19,1	1,7	1,8	-	-
13-4	7,7	4,0	15,2	22,5	19,3	3,1	18,0	1,6	1,7	-	-
13-5	8,0	4,2	16,3	22,2	17,5	4,4	19,4	2,0	2,0	-	-



Pflanze Nr.	Fettsäuren										
	Nicht-Epoxyfettsäuren									Epoxyfettsäuren	
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	22:1	18:1	18:2
13-6	7,9	4,4	25,7	14,7	15,8	2,9	21,2	1,6	1,7	1,56	0,63
13-7	7,9	4,0	16,0	23,3	19,6	3,0	19,1	1,6	1,8	-	-
13-9	8,0	4,0	16,1	23,6	20,0	2,9	18,7	1,6	1,6	-	-
13-10	8,7	4,2	34,6	9,6	12,5	2,2	19,1	1,5	1,2	2,21	1,01
13-11	8,7	4,0	17,6	24,3	18,9	2,8	17,1	1,6	1,4	-	-
13-12	8,9	4,2	26,4	14,6	16,0	2,5	17,5	1,6	1,2	1,62	0,74
13-13	9,0	4,4	27,9	14,4	15,3	2,5	18,9	1,5	1,4	1,30	0,77
13-14	9,2	4,2	17,2	23,8	18,8	2,7	17,9	1,7	1,5	-	-
13-15	8,4	4,2	19,7	20,9	18,6	2,7	17,7	1,4	1,5	0,40	0,16
13-16	8,2	4,3	23,0	17,1	17,3	2,8	19,3	1,5	1,5	0,97	0,42
13-17	8,3	4,1	15,7	23,9	19,9	2,8	17,6	1,6	1,9	-	-
17-1	7,6	4,1	15,8	23,7	19,6	2,6	20,3	1,7	1,7	-	-
17-2	8,3	4,1	16,4	24,4	20,1	2,3	16,8	1,5	1,4	-	-
17-3	8,1	4,1	16,4	24,3	20,0	2,5	17,6	1,6	1,4	-	-
21-1	8,1	4,3	26,9	14,5	15,0	2,9	19,9	1,5	1,5	1,64	0,63
21-2	8,2	4,0	27,9	11,8	13,2	2,5	19,8	1,7	1,5	2,18	0,91
21-3	8,8	3,7	16,4	24,4	20,6	2,5	17,3	1,7	1,4	-	-
21-4	7,9	3,9	19,6	19,8	17,8	2,7	18,7	1,7	1,7	0,66	0,46
21-5	7,2	4,2	26,5	12,9	14,4	3,0	21,5	0,9	1,8	1,78	0,84
21-6	8,3	4,2	27,4	13,9	15,4	2,6	19,9	1,7	1,5	1,66	0,65
21-7	7,2	4,2	26,8	13,5	13,4	3,0	21,9	1,7	1,8	1,74	0,80
21-8	7,4	3,8	16,3	23,6	19,4	3,2	19,2	1,7	1,9	-	-
21-9	7,2	4,0	28,1	11,8	13,5	3,0	22,5	1,9	1,9	2,15	1,05
21-10	7,2	4,2	26,1	13,8	14,6	3,0	22,3	1,7	1,8	1,64	0,82
21-11	7,1	4,2	29,2	11,5	12,7	3,0	22,5	1,8	1,8	2,20	1,09
21-12	7,2	4,1	26,2	13,6	14,2	3,1	22,4	1,8	1,9	1,71	0,80
21-13	7,1	4,3	33,7	7,1	10,0	2,7	24,1	2,0	1,8	3,05	1,47
21-14	7,4	3,7	16,9	21,9	19,6	3,1	19,2	1,8	2,0	0,29	tr
21-15	7,7	3,6	15,6	24,3	20,2	2,9	18,1	1,8	1,8	-	-

## BEISPIEL 8

## Fettsäureanalyse von Cpal2-transgenen Linola-Pflanzen

[0265] Das oben beschriebene binäre Plasmidkonstrukt, das den Cpal2-cDNA-Klon umfasste, (Fig. 9) wurde in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm AGL1 unter Verwendung von Elektroporation transformiert. Das transformierte *A. tumefaciens* wurde zur Infektion von *Linum usitatissimum* var. Eyre-Explantaten gemäß der Beschreibung von Lawrence et al. (1989) verwendet, wobei jedoch MS-Medium als das Basismedium zur Induktion von Wurzeln an regeneriertem Schösslingsmaterial verwendet wurde.

[0266] Für zwei primäre Linola-Transformanten (T0-Pflanzen) der Bezeichnung AP20 und AP21 wurde durch PCR unter Verwendung von Primern, die gegen das Cpal2-Gen gerichtet waren, und durch Zeigen, dass diese Pflanzen kanamycinresistent waren, bestätigt, dass sie transgen sind. Zehn T1-Samen von jeder Pflanze wurden individuell bezüglich der Fettsäurezusammensetzung unter Verwendung von Standardtechniken analysiert.

[0267] Wie in Tabelle 7 gezeigt ist, trennten sich Samen von AP20 in 3 Klassen auf, die aus drei Samen ohne Vernolsäure, zwei mit mehr als 0,7 % Vernolsäure und fünf mit mittleren Konzentrationsmengen (0,13–0,47 %) Vernolsäure bestanden.

[0268] In ähnlicher Weise trennten sich Samen von AP21 in 3 Klassen auf, die aus fünf Samen ohne Vernolsäure, zwei mit mehr als 0,25 % Vernolsäure und drei mit einer mittleren Konzentrationsmenge (0,09–0,14 %) Vernolsäure bestanden (Tabelle 8).

[0269] Daher wurden insgesamt zwölf Samen erhalten, die Vernolsäure enthielten. Acht von den zwölf AP20- und AP21-Samen, die Vernolsäure enthielten, enthielten auch 12,13-Epoxy-9,15-octadecadiensäure.

TABELLE 7

Fettsäurezusammensetzung von 10 individuellen T1-Samen von der Linola-Cpal2-Primärtransformanten AP20

T <sub>1</sub> - Samen	Nicht-Epoxyfettsäuren									Epoxyfettsäuren	
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	22:1	18:1	18:2
1	6,4	3,6	17,8	68,1	2,0	0,2	-	0,6	-	-	-
2	6,0	3,5	25,4	60,8	1,4	0,2	0,2	-	-	0,70	0,23
3	6,0	3,9	20,4	64,6	2,1	0,3	0,6	-	-	-	-
4	6,3	3,5	28,3	57,3	1,3	0,2	0,2	1,4	-	0,34	0,28
5	5,2	4,8	24,9	61,2	1,6	0,3	0,2	0,1	-	0,37	-
6	5,8	4,1	23,3	63,1	1,9	0,2	0,2	0,2	-	0,47	-
7	5,9	4,3	21,7	64,1	2,2	0,2	0,2	0,2	-	0,13	0,12
8	5,9	3,3	22,3	65,2	2,0	0,2	0,2	0,1	0,2	-	-
9	5,6	4,0	25,2	61,4	1,7	0,2	0,2	0,1	-	0,84	-
10	6,2	4,4	27,4	57,9	1,7	0,2	0,2	0,2	-	0,54	-

TABELLE 8

Fettsäurezusammensetzung von 10 individuellen T1-Samen von der Linola-Cpal2-Primärtransformanten AP21

T <sub>1</sub> - Samen	Nicht-Epoxyfettsäuren									Epoxyfettsäuren	
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	22:1	18:1	18:2
1	6,1	4,2	35,2	50,8	1,3	-	-	-	2,0	-	-
2	5,7	5,0	32,9	53,3	1,4	0,2	0,2	0,2	-	0,14	0,21
3	5,9	4,0	35,1	50,8	1,3	0,2	0,2	0,1	1,5	-	-
4	7,5	4,1	38,8	45,5	1,2	0,2	0,3	-	1,7	-	-
5	5,8	5,0	28,8	57,3	1,3	0,2	0,2	0,1	-	0,37	0,06
6	5,8	5,0	44,1	41,4	1,4	0,2	0,2	0,2	-	-	-
7	6,5	4,5	27,9	58,6	1,3	0,2	0,1	0,1	-	-	-
8	6,9	4,6	37,6	48,1	1,2	-	-	-	-	0,10	0,19
9	6,2	4,7	33,7	52,1	1,3	0,2	0,2	0,2	-	0,09	0,07
10	6,1	4,8	29,7	56,6	1,3	0,2	0,2	0,1	-	0,25	0,04

[0270] Vier T1-Pflanzen wurden aus den kanamycinresistenten Schösslingen von AP20 etabliert. Für alle vier Pflanzen wurde anschließend gezeigt, dass sie Vernolsäure in deren T2-Samen produzieren (Tabelle 9). Die Konzentrationsmengen von 18:2-Epoxyfettsäuren wurden in diesen T2-Samen nicht analysiert.

TABELLE 9

Fettsäurezusammensetzung von T2-Samen der Linola-Cpal2-T1-Nachkommen von AP20

T <sub>2</sub> - Samen	Nicht-Epoxyfettsäuren									Epoxy-Fett- säure
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	20:1	22:0	22:1	18:1
A	3,4	3,0	27,4	65,5	0,6	na	na	na	na	0,06
B	3,5	3,1	30,2	62,6	0,6	na	na	na	na	0,07
C	3,6	2,7	33,3	59,8	0,6	na	na	na	na	0,07
D	3,4	3,1	28,2	64,6	0,6	na	na	na	na	0,11

na = nicht analysiert

## BEISPIEL 9

## Produktion von Epoxyfettsäuren in transgenen Organismen

**[0271]** Die Produktion eines an Vernolsäure reichen Öls wurde durch Transformation des hierin beschriebenen Epoxygenasegens, insbesondere SEQ ID NO: 1, in *Arabidopsis thaliana* gemäß der Beschreibung in den vorhergehenden Beispielen erreicht. Wie in Tabelle 5 angegeben ist, produzieren transgene *A. thaliana*-Linien, die SEQ ID NO: 1 exprimieren, in ihren Samen hohe Konzentrationsmengen an Vernolsäure, in Bezug auf andere Fettsäuren. Insbesondere beträgt in einer transgenen Linie (Cpal-17) die produzierte Vernolsäure die große Menge von 15,2 % (Gew/Gew) des Gesamtsamenfettsäuregehalts.

**[0272]** Die Produktion eines an Vernolsäure reichen Öls wird auch durch Transformation des hierin beschriebenen Epoxygenasegens, beliebig eines von SEQ ID NO: 1, 3, 5, 19, oder 20 und vorzugsweise beliebig eines von SEQ ID NO: 1 oder 3 oder 5, in einen ölanreichernden Organismus, der normalerweise sehr hohe Konzentrationsmengen an Linolsäure und minimal andere konkurrierende Enzymaktivitäten mit der Fähigkeit zur Verwendung von Linolsäure als Substrat aufweist, erreicht. Die Gensequenzen der Erfindung werden funktional unter die Kontrolle eines Promotors, der eine hochgradige Expression in Ölsamen hervorruft, beispielsweise den samenspezifischen Napin-Promotor, gestellt.

**[0273]** In einem alternativen Ansatz zur Transformation von *A. thaliana* werden Genotypen mit hohem Linolgehalt von Flachs, Sonnenblume, Mais oder Saflor mit der Epoxygenase der Erfindung transformiert. Hohe Konzentrationsmengen an Vernolsäure werden durch die transgenen Pflanzen während der Samenölsynthese produziert, wenn das Epoxygenasegen in hohen Graden exprimiert wird.

**[0274]** Alternativ wird Linola<sup>®</sup>(= wenig Linolensäure)-Flachs mit der Epoxygenase der Erfindung transformiert. Hohe Konzentrationsmengen an Vernolsäure werden durch die transgenen Linola<sup>®</sup>-Flachspflanzen während der Samenölsynthese produziert, wenn das Epoxygenasegen in hohen Graden exprimiert wird.

**[0275]** Ferner zeigten die Erfinder, dass markierte Vernolsäure, die sich entwickelnden Flachssamen zugeführt wird, nicht abgebaut wird, sondern in Speicherlipide in allen drei Positionen des Triglyceridmoleküls eingebaut wird (siehe Beispiel 10). Konsistent mit diesen Daten werden hohe Konzentrationsmengen an Vernolsäure, die durch die eingeführte Epoxygenase synthetisiert werden, in den Samenöltriglyceriden dieser Art ohne weiteres deponiert.

## BEISPIEL 10

## Einbau von Ölsäure und Vernolsäure in die Lipide von sich entwickelnden Leinsamenkotyledonen

**[0276]** Abgelöste, sich entwickelnde Leinsamenkotyledonen (sechs Paare bei jeder Inkubation, doppelte Inkubationen) im mittleren Stadium der Samenentwicklung (20 Tage nach dem Blühen) wurden mit 10 nmol der Ammoniumsalze von entweder [1-<sup>14</sup>C]Vernolsäure (spezifische Aktivität 3000 dpm/nmol) oder [1-<sup>14</sup>C]Ölsäure (spezifische Aktivität 5000 dpm/nmol) in 0,2 ml Phosphatpuffer, pH 7,2, 30 min bei 30 °C inkubiert. Die Kotle-

donen wurden dann dreimal mit 1 ml destilliertem Wasser gespült und entweder unmittelbar in einer Ultra Tur-rax gemäß Bligh und Dyer (1959) extrahiert oder des weiteren in 0,5 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2, 90 oder 270 min vor der Extraktion inkubiert. Ein Aliquot der Lipide in der Chloroformphase wurde methyliert und auf Silicagel-DC-Platten in n-Hexan/Diethylether/Essigsäure (85:15:1) getrennt. Der Rest der Lipide in der Chloroformphase jeder Probe wurde auf zwei getrennte Silicagel-DC-Platten appliziert und die Platten wurden in Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser (85:15:10:3,5, bezogen auf das Volumen) zur Auftrennung polarer Lipide und in n-Hexan/Diethylether/Essigsäure (60:40:1,5) zur Auftrennung neutraler Lipide entwickelt. Lipidbereiche mit einer Migration, die authentischen Standards entsprach, wurden entfernt und die Radioaktivität in jedem Lipid wurde durch Flüssigszintillationszählung quantitativ bestimmt.

**[0277]** Die Rückgewinnung der  $^{14}\text{C}$ -Markierung in der Chloroformphase ist in [Fig. 12](#) angegeben. Etwas mehr als die Hälfte der zugegebenen Radioaktivität von sowohl  $^{14}\text{C}$ Ölsäure als auch  $^{14}\text{C}$ Vernolsäure wurde durch die Kotyledonen aufgenommen und als lipophile Substanzen nach der Pulsmarkierung von 30 min zurückge-wonnen. Diese Menge blieb während der weiteren 270 min Inkubation mit beiden Substraten tatsächlich un-verändert. Die Auftrennung radioaktiver Methylester von den Lipiden zeigte, dass der größte Teil der Radioak-tivität (92 %) von  $^{14}\text{C}$ Vernolsäure-Zufuhrexperimenten in Verbindungen mit der gleichen Wanderung wie Me-thylvernoleat lag, was anzeigt, dass die Epoxygruppe in den Leinsamenkotyledonen über die 270 min Inku-bation intakt blieb.

**[0278]** Etwa 28 % der Aktivität von der Zufuhr von  $^{14}\text{C}$ Vernolsäure, die in der Chloroformphase vorhanden war, fanden sich in Phosphatidylcholin nach 30 min und die Radioaktivität nahm auf nur 5 % nach 300 min In-kubation ab ([Fig. 13](#)).

**[0279]** Etwa 22 % der Aktivität von der Zufuhr von  $^{14}\text{C}$ Ölsäure, die in der Chloroformphase vorhanden war, fanden sich in Phosphatidylcholin nach 30 min und die Radioaktivität nahm auf etwa 11 % nach 300 min Inku-bation ab ([Fig. 13](#)).

**[0280]** Etwa 32 % der Aktivität von der Zufuhr von  $^{14}\text{C}$ Vernolsäure, die in der Chloroformphase vorhanden war, fanden sich nach 30 min in Triacylglycerinen und die Radioaktivität nahm auf über 60 % nach 300 min Inkubation zu ([Fig. 14](#)). Die Diacylglycerine enthielten etwa 24 % der Aktivität in den  $^{14}\text{C}$ Vernolsäure-Zu-fuhrexperimenten und diese Menge blieb über die Inkubationsperioden ziemlich konstant.

**[0281]** Etwa 5 % der Aktivität von der Zufuhr von  $^{14}\text{C}$ Ölsäure, die in der Chloroformphase vorhanden war, fanden sich nach 30 min in Triacylglycerinen und die Radioaktivität nahm auf 18 nach 300 min Inkubation zu ([Fig. 14](#)). Die Diacylglycerine enthielten etwa 19 % der Aktivität in den  $^{14}\text{C}$ Ölsäure-Zufuhrexperimenten und diese Menge blieb über die Inkubationsperioden ziemlich konstant.

**[0282]** Das obige Experiment zeigt, dass Leinsamenkotyledonen die Epoxygruppe von Vernolsäure nicht in großem Ausmaß metabolisieren. Es zeigt ferner, dass Leinsamenkotyledonen Mechanismen zur effizienten Entfernung von Vernolsäure aus Membranlipiden und zum Einbau derselben in Triacylglyceride besitzen.

## BEISPIEL 11

### Klonierung von p12-Epoxygenasegenen aus andere Epoxysäuren enthaltenden Arten

**[0283]** Homologa des Cpal-p12-Epoxygenasegens werden von anderen Arten, die an Epoxylipidsäuren reich sind, durch Klonieren der Mitglieder der Genfamilie von p12-Monooxygenasen gemischter Funktion, die in sich entwickelnden Samen hoch exprimiert werden, und Vergleichen von deren Aminosäuresequenz mit denen be-kannter p12-Desaturase- und p12-Epoxygenasesequenzen erhalten. Derartige Gene werden entweder durch Screening von cDNA-Bibliotheken von sich entwickelnden Samen mit Gensonden auf der Basis von entweder dem Cpal2-Gen (SEQ ID NO: 1) oder dem D12V-Fragment (SEQ ID NO: 7) oder durch Amplifikation von PCR-Fragmenten unter Verwendung von Primern, die gegen konservierte Sequenzen der p12-Monooxygena-sen gemischter Funktion von Pflanzen gestaltet sind, wie hierin beschrieben, kloniert. Vermutliche p12-Epoxy-genasesequenzen zeigen eine größere Gesamtsequenzidentität mit den hierin offenbarten p12-Epoxygenase-sequenzen als den bekannten p12-Desaturasesequenzen.

**[0284]** In einem Beispiel für diesen Ansatz wurde eine einer p12-Epoxygenase voller Länge ähnliche Sequenz von einer nichtidentifizierten *Crepis* sp., die hohe Konzentrationen an Vernolsäure in deren Samenölen enthielt und von der bekannt ist, dass sie nicht *Crepis palaestina* ist, erhalten. Poly(A)+RNA wurde aus sich entwickelnden Samen dieser *Crepis* sp. unter Verwendung eines QuickPrep Micro mRNA Purification Kit

(Pharmacia Biotechnology) isoliert und zur Synthese einer Oligosaccharid-d(T)-primed doppelsträngigen cDNA verwendet. Die auf diese Weise erhaltene doppelsträngige cDNA wurde dann mit EcoR1/NotI-Adaptoren (Pharmacia Biotechnology) ligiert und eine cDNA-Bibliothek wurde unter Verwendung des ZAP-cDNA Gigapack Cloning Kit (Stratagene) konstruiert. Die cDNA-Bibliothek auf Hybond N+-Membranfiltern (Amersham) wurde mit dem statistisch markierten D12V-Fragment (SEQ ID NO: 7), das von *Crepis alpina* stammte, gemäß der Vorschrift des Herstellers unter Verwendung von Standardhybridisierungsbedingungen gescreent. Dies führte zur Reinigung eines rekombinanten Bakteriophagen der Bezeichnung CrepX.

**[0285]** Die Nucleotidsequenz der CrepX-cDNA wurde bestimmt und ist in SEQ ID NO: 3 angegeben. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von CrepX (SEQ ID NO: 4) umfasst ein Protein von 374 Aminosäuren mit 97 % Identität mit der Cpal2-p12-Epoxygenase-sequenz, jedoch nur 57 % Identität mit der L26296-p12-Desaturase-sequenz von *Arabidopsis thaliana*. Dies zeigt klar das Vorhandensein eines Gens in einer anderen *Crepis* sp., die einen hohen Vernolsäuregehalt aufweist, wobei dieses Gen stark homolog zu dem Cpal2-p12-Epoxygenasegen ist und deutlich kein Desaturasegen ist.

**[0286]** In einem zweiten Beispiel für diesen Ansatz wurde eine partielle, p12-Epoxygenase ähnliche Sequenz aus der Vernolsäure enthaltenden Art *Vernonia galamensis* erhalten. Erststrang-cDNA-Template wurden von Gesamt-RNA, die aus sich entwickelnden Samen von *V. galamensis* isoliert wurde, unter Verwendung von Standardverfahren hergestellt.

**[0287]** Ein PCR-Fragment (einer Länge von 550 Nucleotiden) der Bezeichnung Vgal1 wurde durch Amplifikation der einzelsträngigen cDNA unter Verwendung von Primern, die von der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Monooxygenasen gemischter Funktion von Pflanzen abgeleitet wurden, erhalten. Die Nucleotidsequenz der amplifizierten DNA wurde unter Verwendung von Standardverfahren bestimmt und ist in SEQ ID NO: 5 angegeben.

**[0288]** Das Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Vgal1-PCR-Fragments (SEQ ID NO: 6) mit der vollen Sequenz von Cpal2-p12-Epoxygenase und der L26296-p12-Desaturase von *Arabidopsis thaliana* (**Fig. 2**) zeigt, dass die amplifizierte Vgal1-Sequenz für eine Aminosäuresequenz codiert, die der die Aminosäurereste 103–285 umspannenden Region des Cpal2-Polypeptids entspricht. In dieser Region zeigte die Vgal1-Sequenz größere Aminosäureidentität mit der Cpal2-p12-Epoxygenase-sequenz (67 %) als mit der p12-Desaturase-sequenz von *A. thaliana* (60 %), was nahe legt, dass die amplifizierte DNA eher einer Epoxygenase- als einer Desaturase-sequenz entspricht.

**[0289]** Dem Fachmann ist klar, dass die vorliegende Erfindung anderen Variationen und Modifikationen als den speziell hier beschriebenen unterzogen werden kann. Es ist klar, dass die Erfindung alle derartigen Varianten und Modifikationen umfasst. Die Erfindung umfasst auch alle Stufen, Merkmale, Zusammensetzungen und Verbindungen, auf die in dieser Beschreibung individuell oder kollektiv verwiesen wurde oder die angegeben sind, und alle möglichen Kombinationen von beliebigen zwei oder mehreren der Stufen oder Merkmale.

#### LITERATURSTELLEN

1. An et al. (1985) EMBO J. 4:277–284.
2. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., und Struhl, K. (1987). In: Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience (ISBN 047150338).
3. Badami, R.C. und Patil, K.B. (1981) Progress in Lipid Research, 19, 119–53.
4. Bafor, M., Smith, M.A., Jonsson, L., Stobart, K. und Stymne, S. (1993) Arch. Biochem. Biophys. 303, 145–151.
5. Bafor, M., Banas, A., Wiberg, E., Lenman, M., Stahl, U. und Stymne, S. (1997) In: Williams, J.P., Mobasher, K.U., Lem, N.W. (Hrsg.) Physiology, biochemistry and molecular biology of plant lipids. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. Im Druck
6. Blee und Schuber (1990) J. Biol. Chem. 265, 12887–12894.
7. Blee, E., Wilcox, A.L., Marnett, J.M., Schuber, F. (1993) J. Biol. Chem. 268, 1798–1715.
8. Blee, E., Stahl, S., Schuber, F. und Stymne, S. (1994) Biochem. Biophys. Res. Comm. 197, 778–784
9. Bligh, E.G. und Dyer, W.J. (1959) Can. J. Biochem. Physiol. 230, 379–288.
10. Bozak, K.R., Yu, H., Sirevag, R. und Christoffersen, R.E. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3904–3908.
11. Christou, P., McCabe, D.E., Swain, W.F. (1988). Plant Physiol 87, 671–674.
12. Crossway et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202, 179–185.
13. Devereux, J., Haeberli, P. und Smithies, O. (1984). Nucl. Acids Res. 12, 387–395.
14. Dolferus et al. Plant Physiol. (1994) 105, 1075–1087.

15. Engeseth, N. & Stymne, S. (1996) *Planta* 198, 238–245
16. Fromm et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82, 5824–5828.
17. Haseloff, J. und Gerlach, W.L. (1988). *Nature* 334, 586–594.
18. Herrera-Estrella et al. (1983a) *Nature* 303, 209–213.
19. Herrera-Estrella et al. (1983b) *EMBO J.* 2, 987–995.
20. Herrera-Estrella et al. (1985) In: *Plant Genetic Engineering*, Cambridge University Press, NY, S. 63–93.
21. Kohn, G., Hartmann, E., Stymne, S. & Beutelmann, P. (1994) *J. Plant Physiol.* 144, 265–271
22. Krens, F.A., Molendijk, L., Wullems, G.J. und Schilperoort, R.A. (1982). *Nature* 296, 72–74.
23. Lawrence, G.J., Ellis, J.G., Finnegan, E.J., Dennis, E.S. und Peacock, W. J. (1989) In: *Breeding Research: The Key to Survival of the Earth* (Iyama, S. und Takeda, G. (Hrsg.) 6th International Congress of SABRAO, S. 535–538.
24. Lazo, G.R., Stein, P.A. und Ludwig, R.A. (1991). *Bio/technology* 9, 963–967.
25. Needleman und Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443–453.
26. Pazkowski et al. (1984) *EMBO J.* 3, 2717–2722.
27. Pietrzak, M., Shillito, R.D., Hohn, T. und Potrykus, I. (1986). *Nucl. Acids Res.* 14, 5857–5868.
28. Sanger, F., Nicklin, S. und Coulson, A.R. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 72, 5463–5467.
29. Shanklin, J., Whittle, E. und Fox, B.G. (1994) *Biochemistry* 33, 12787–12794.
30. Valvekens et al. (1988) *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 85, 5536–5540.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER: Commonwealth Scientific and Industrial Research  
Organisation AND Sten Styme
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: PFLANZENFETTSÄUREEPOXYGENASEGENE  
UND VERWENDUNGSMÖGLICHKEITEN HIERFÜR
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 20
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
  - (A) ADRESSAT: DAVIES COLLISON CAVE
  - (B) STRASSE: 1 LITTLE COLLINS STREET
  - (C) STADT: MELBOURNE
  - (D) STAAT: VICTORIA
  - (E) LAND: AUSTRALIEN
  - (F) ZIP: 3000
- (v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
  - (A) DATENTRÄGER: Diskette
  - (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
  - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release 1.0, Version 1.25
- (vi) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:
  - (A) ANMELDENUMMER:
  - (B) ANMELDETAG:
- (vii) DATEN DER VORANMELDUNG:
  - (A) ANMELDENUMMER: AU PO6223
  - (B) ANMELDETAG: 15. APRIL 1997
- (vii) DATEN DER VORANMELDUNG:
  - (A) ANMELDENUMMER: AU PO6226
  - (B) ANMELDETAG: 15. APRIL 1997
- (vii) DATEN DER VORANMELDUNG:
  - (A) ANMELDENUMMER: US 60/043706
  - (B) ANMELDETAG: 16. APRIL 1997

- (vii) DATEN DER VORANMELDUNG:  
 (A) ANMELDENUMMER: US 60/050403  
 (B) ANMELDETAG: 20. JUNI 1997
- (viii) ANGABEN ZU ANWALT/VERTRETER:  
 (A) NAME: Dr. E. JOHN L. HUGHES  
 (C) REFERENZ/AKTENZEICHEN: MRO/IJH/JMC
- (ix) TELEKOMMUNIKATIONSANGABEN:  
 (A) TELEFON: +61 3 9254 2777  
 (B) TELEFAX: +61 3 9254 2770  
 (C) TELEX: AA 318787

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:  
 (A) LÄNGE: 1358 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleinsäure  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA
- (ix) MERKMAL:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
 (B) LAGE: 30..1151
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAGAAGTTGA CCATAAATCA TTTATCAAC ATG GGT GCC GGC GGT CGT GGT CGG	53
Met Gly Ala Gly Gly Arg Gly Arg	
1 5	
ACA TCG GAA AAA TCG GTC ATG GAA CGT GTC TCA GTT GAT CCA GTA ACC	101
Thr Ser Glu Lys Ser Val Met Glu Arg Val Ser Val Asp Pro Val Thr	
10 15 20	
TTC TCA CTG AGT GAA TTG AAG CAA GCA ATC CCT CCC CAT TGC TTC CAG	149
Phe Ser Leu Ser Gly Leu Lys Glu Ala Ile Pro Pro His Cys he Glu	
25 30 35 40	



AGA TCT GTA ATC CGC TCA TCT TAC TAT GTT GTT CAA GAT CTC ATT ATT	197
Arg Ser Val Ile Arg Ser Ser Tyr Tyr Val Val Gln Asp Leu Ile Ile	
45 50 55	
GCC TAC ATC TTC TAC TTC CTT GCC AAC ACA TAT ATC CCT ACT CTT CCT	245
Ala Tyr Ile Phe Tyr Phe Leu Ala Asn Thr Tyr Ile Pro Thr Leu Pro	
60 65 70	
ACT AGT CTA GCC TAC TTA GCT TGG CCC GTT TAC TGG TTC TGT CAA GCT	293
Thr Ser Leu Ala Tyr Leu Ala Trp Pro Val Tyr Trp Phe Cys Gln Ala	
75 80 85	
AGC GTC CTC ACT GGC TTA TGG ATC CTC GGC CAC GAA TGT GGT CAC CAT	341
Ser Val Leu Thr Gly Leu Trp Ile Leu Gly His Glu Cys Gly His His	
90 95 100	
GCC TTT AGC AAC TAC ACA TGG TTT GAC GAC ACT GTG GGC TTC ATC CTC	389
Ala Phe Ser Asn Tyr Thr Trp Phe Asp Asp Thr Val Gly Phe Ile Leu	
105 110 115 120	
CAC TCA TTT CTC CTC ACC CCG TAT TTC TCT TGG AAA TTC AGT CAC CGG	437
His Ser Phe Leu Leu Thr Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Phe Ser His Arg	
125 130 135	
AAT CAC CAT TCC AAC ACA AGT TCG ATT GAT AAC GAT GAA GTT TAC ATT	485
Asn His His Ser Asn Thr Ser Ser Ile Asp Asn Asp Glu Val Tyr Ile	
140 145 150	
CCG AAA AGC AAG TCC AAA CTC GCG CGT ATC TAT AAA CTT CTT AAC AAC	533
Pro Lys Ser Lys Ser Lys Leu Ala Arg Ile Tyr Lys Leu Leu Asn Asn	
155 160 165	
CCA CCT GGT CGG CTG TTG GTT TTG ATT ATC ATG TTC ACC CTA GGA TTT	581
Pro Pro Gly Arg Leu Leu Val Leu Ile Ile Met Phe Thr Leu Gly Phe	
170 175 180	
CCT TTA TAC CTC TTG ACA AAT ATT TCC GGC AAG AAA TAC GAC AGG TTT	629

Pro	Leu	Tyr	Leu	Leu	Thr	Asn	Ile	Ser	Gly	Lys	Lys	Tyr	Asp	Arg	Phe				
185						190					195				200				
GCC	AAC	CAC	TTC	GAC	CCC	ATG	AGT	CCA	ATT	TTC	AAA	GAA	CGT	GAG	CGG				677
Ala	Asn	His	Phe	Asp	Pro	Met	Ser	Pro	Ile	Phe	Lys	Glu	Arg	Glu	Arg				
				205					210					215					
TTT	CAG	GTC	TTC	CTT	TCG	GAT	CTT	GGT	CTT	CTT	GCC	GTG	TTT	TAT	GGA				725
Phe	Gln	Val	Phe	Leu	Ser	Asp	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Val	Phe	Tyr	Gly				
				220				225					230						
ATT	AAA	GTT	GCT	GTA	GCA	AAT	AAA	GGA	GCT	GCT	TGG	GTA	GCG	TGC	ATG				773
Ile	Lys	Val	Ala	Val	Ala	Asn	Lys	Gly	Ala	Ala	Trp	Val	Ala	Cys	Met				
		235					240					245							
TAT	GGA	GTT	CCG	GTA	TTA	GGC	GTA	TTT	ACC	TTT	TTC	GAT	GTG	ATC	ACC				821
Tyr	Gly	Val	Pro	Val	Leu	Gly	Val	Phe	Thr	Phe	Phe	Asp	Val	Ile	Thr				
		250				255					260								
TTC	TTG	CAC	CAC	ACC	CAT	CAG	TCG	TCG	CCT	CAT	TAT	GAT	TCA	ACT	GAA				869
Phe	Leu	His	His	Thr	His	Gln	Ser	Ser	Pro	His	Tyr	Asp	Ser	Thr	Glu				
		265			270					275				280					
TGG	AAC	TGG	ATC	AGA	GGG	GCC	TTG	TCA	GCA	ATC	GAT	AGG	GAC	TTT	GGA				917
Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Ile	Asp	Arg	Asp	Phe	Gly				
				285				290					295						
TTC	CTG	AAT	AGT	GTT	TTC	CAT	GAT	GTT	ACA	CAC	ACT	CAT	GTC	ATG	CAT				965
Phe	Leu	Asn	Ser	Val	Phe	His	Asp	Val	Thr	His	Thr	His	Val	Met	His				
				300				305					310						
CAT	TTG	TTT	TCA	TAC	ATT	CCA	CAC	TAT	CAT	GCA	AAG	GAG	GCA	AGG	GAT				1013
His	Leu	Phe	Ser	Tyr	Ile	Pro	His	Tyr	His	Ala	Lys	Glu	Ala	Arg	Asp				
		315				320						325							
GCA	ATC	AAG	CCA	ATC	TTG	GGC	GAC	TTT	TAT	ATG	ATC	GAC	AGG	ACT	CCA				1061
Ala	Ile	Lys	Pro	Ile	Leu	Gly	Asp	Phe	Tyr	Met	Ile	Asp	Arg	Thr	Pro				
		330				335					340								
ATT	TTA	AAA	GCA	ATG	TGG	AGA	GAG	GGC	AGG	GAG	TGC	ATG	TAC	ATC	GAG				1109

Ile Leu Lys Ala Met Trp Arg Glu Gly Arg Glu Cys Met Tyr Ile Glu  
 345 350 355 360

CCT GAT AGC AAG CTC AAA GGT GTT TAT TGG TAT CAT AAA TTG 1151  
 Pro Asp Ser Lys Leu Lys Gly Val Tyr Trp Tyr His Lys Leu  
 365 370

TGATCATATG CAAAATGCAC ATGCATTTTC AAACCTCTA GTTACGTTTG TTCTATGTAT 1211

AATAAACCGC CGGTCCTTTG GTTGACTATG CCTAAGCCAG GCGAAACAGT TAAATAATAT 1271

CGGTATGATG TGTAATGAAA GTATGTGGTT GTCTGGTTTT GTTGCTATGA AAGAAAGTAT 1331

GTGGTTGTCG GTCAAAAAAA AAAAAA 1358

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 374 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Gly Ala Gly Gly Arg Gly Arg Thr Ser Glu Lys Ser Val Met Glu  
 1 5 10 15

Arg Val Ser Val Asp Pro Val Thr Phe Ser Leu Ser Glu Leu Lys Gln  
 20 25 30

Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Gln Arg Ser Val Ile Arg Ser Ser Tyr  
 35 40 45

Tyr Val Val Gln Asp Leu Ile Ile Ala Tyr Ile Phe Tyr Phe Leu Ala  
 50 55 60

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

Ser Pro His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp Asn Trp Ile Arg Gly Ala Leu  
 275 280 285

Ser Ala Ile Asp Arg Asp Phe Gly Phe Leu Asn Ser Val Phe His Asp  
 290 295 300

Val Thr His Thr His Val Met His His Leu Phe Ser Tyr Ile Pro His  
 305 310 315 320

Tyr His Ala Lys Glu Ala Arg Asp Ala Ile Lys Pro Ile Leu Gly Asp  
 325 330 335

Phe Tyr Met Ile Asp Arg Thr Pro Ile Leu Lys Ala Met Trp Arg Glu  
 340 345 350

Gly Arg Glu Cys Met Tyr Ile Glu Pro Asp Ser Lys Leu Lys Gly Val  
 355 360 365

Tyr Trp Tyr His Lys Leu  
 370

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1312 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Crepis sp.

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 26..1147

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

TGTTGACCAT AAATCATCTA TCAAC ATG GGT GCC GGC GGC CGT GGT CGG ACA	52
Met Gly Ala Gly Gly Arg Gly Arg Thr	
1 5	
TCG GAA AAG TCG GTC ATG GAA CGT GTC TCA GTT GAT CCA GTA ACC TTC	100
Ser Glu Lys Ser Val Met Glu Arg Val Ser Val Asp Pro Val Thr Phe	
10 15 20 25	
TCA CTG AGT GAT TTG AAG CAA GCA ATC CCT CCA CAT TGC TTC CAG CGA	148
Ser Leu Ser Asp Leu Lys Gln Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Gln Arg	
30 35 40	
TCT GTC ATC CGT TCA TCT TAT TAC GTT GTT CAG GAT CTC ATA ATT GCC	196
Ser Val Ile Arg Ser Ser Tyr Tyr Val Val Gln Asp Leu Ile Ile Ala	
45 50 55	
TAC ATC TTC TAC TTC CTT GCC AAC ACA TAT ATC CCT AAT CTC CCT CAT	244
Tyr Ile Phe Tyr Phe Leu Ala Asn Thr Tyr Ile Pro Asn Leu Pro His	
60 65 70	
CCT CTA GCC TAC TTA GCT TGG CCG CTT TAC TGG TTC TGT CAA GCT AGC	292
Pro Leu Ala Tyr Leu Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Phe Cys Gln Ala Ser	
75 80 85	
GTC CTC ACT GGG TTA TGG ATC CTC GGC CAT GAA TGT GGT CAC CAT GCC	340
Val Leu Thr Gly Leu Trp Ile Leu Gly His Glu Cys Gly His His Ala	
90 95 100 105	
TAT AGC AAC TAC ACA TGG GTT GAC GAC ACT GTG GGC TTC ATC ATC CAT	388
Tyr Ser Asn Tyr Thr Trp Val Asp Asp Thr Val Gly Phe Ile Ile His	
110 115 120	
TCA TTT CTC CTC ACC CCG TAT TTC TCT TGG AAA TAC AGT CAC CGG AAT	436
Ser Phe Leu Leu Thr Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Asn	
125 130 135	

CAC CAT TCC AAC ACA AGT TCG ATT GAT AAC GAT GAA GTT TAC ATT CCG	484
His His Ser Asn Thr Ser Ser Ile Asp Asn Asp Glu Val Tyr Ile Pro	
140 145 150	
AAA AGC AAG TCC AAA CTC AAG CGT ATC TAT AAA CTT CTT AAC AAC CCA	532
Lys Ser Lys Ser Lys Leu Lys Arg Ile Tyr Lys Leu Leu Asn Asn Pro	
155 160 165	
CCT GGT CGA CTG TTG GTT TTG GTT ATC ATG TTC ACC CTA GGA TTT CCT	580
Pro Gly Arg Leu Leu Val Leu Val Ile Met Phe Thr Leu Gly Phe Pro	
170 175 180 185	
TTA TAC CTC TTG ACA AAT ATT TCC GGC AAG AAA TAC GAT AGG TTT GCC	628
Leu Tyr Leu Leu Thr Asn Ile Ser Gly Lys Lys Tyr Asp Arg Phe Ala	
190 195 200	
AAC CAC TTC GAC CCC ATG AGT CCA ATT TTC AAA GAA CGT GAG CGG TTT	676
Asn His Phe Asp Pro Met Ser Pro Ile Phe Lys Glu Arg Glu Arg Phe	
205 210 215	
CAG GTC TTC CTT TCG GAT CTT GGT CTT CTT GCT GTG TTT TAT GGA ATT	724
Gln Val Phe Leu Ser Asp Leu Gly Leu Leu Ala Val Phe Tyr Gly Ile	
220 225 230	
AAA GTT GCT GTA GCA AAT AAA GGA GCT GCT TGG GTG GCG TGC ATG TAT	772
Lys Val Ala Val Ala Asn Lys Gly Ala Ala Trp Val Ala Cys Met Tyr	
235 240 245	
GGA GTT CCG GTG CTA GGC GTA TTT ACC TTT TTC GAT GTG ATC ACG TTC	820
Gly Val Pro Val Leu Gly Val Phe Thr Phe Phe Asp Val Ile Thr Phe	
250 255 260 265	
TTA CAC CAC ACC CAT CAG TCG TCG CCT CAT TAT GAT TCA ACT GAA TGG	868
Leu His His Thr His Gln Ser Ser Pro His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp	
270 275 280	
AAC TGG ATC AGA GGG GCT TTG TCA GCA ATC GAT AGN GAC TTT GGG TTC	916
Asn Trp Ile Arg Gly Ala Leu Ser Ala Ile Asp Arg Asp Phe Gly Phe	
285 290 295	

CTG AAT AGT GTT TTC CAT GAT GTN ACA CAC ACT CAC GTC ATG CAT CAT	964
Leu Asn Ser Val Phe His Asp Val Thr His Thr His Val Met His His	
300 305 310	
TTG TTT TCA TAC ATT CCA CAC TAT CAT GCA AAG GAA GCA AGG GAT GCA	1012
Leu Phe Ser Tyr Ile Pro His Tyr His Ala Lys Glu Ala Arg Asp Ala	
315 320 325	
ATC AAA CCG ATC TTG GGC GAC TTT TAT ATG ATC GAT AGG ACT CCA ATT	1060
Ile Lys Pro Ile Leu Gly Asp Phe Tyr Met Ile Asp Arg Thr Pro Ile	
330 335 340 345	
TTA AAA GCA ATG TGG AGA GAG GGC AGG GAA TGC ATG TAC ATC GAG CCT	1108
Leu Lys Ala Met Trp Arg Glu Gly Arg Glu Cys Met Tyr Ile Glu Pro	
350 355 360	
GAT AGC AAG CTC AAA GGT GTT TAT TGG TAT CAT AAA TTG TGATCATATG	1157
Asp Ser Lys Leu Lys Gly Val Tyr Trp Tyr His Lys Leu	
365 370	
CAAAATGCAC ATGCATTTTC AAACCCTCTA GTTACCTTTG TTCTATGTAT AATAAGACCG	1217
CCGGTCCTAT GGTTTTCTAT GCCTAAGCCA GCGGAAATAG TTAAATAATA TCGGTATGAT	1277
GTAATGAAAG TATGTGGTTG TCTAAAAAAA AAAAA	1312

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 374 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:



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

Gly Leu Leu Ala Val Phe Tyr Gly Ile Lys Val Ala Val Ala Asn Lys  
 225 230 235 240

Gly Ala Ala Trp Val Ala Cys Met Tyr Gly Val Pro Val Leu Gly Val  
 245 250 255

Phe Thr Phe Phe Asp Val Ile Thr Phe Leu His His Thr His Gln Ser  
 260 265 270

Ser Pro His Tyr Asp Ser Thr Gly Trp Asn Trp Ile Arg Gly Ala Leu  
 275 280 285

Ser Ala Ile Asp Arg Asp Phe Gly Phe Leu Asn Ser Val Phe His Asp  
 290 295 300

Val Thr His Thr His Val Met His His Leu Phe Ser Tyr Ile Pro His  
 305 310 315 320

Tyr His Ala Lys Glu Ala Arg Asp Ala Ile Lys Pro Ile Leu Gly Asp  
 325 330 335

Phe Tyr Met Ile Asp Arg Thr Pro Ile Leu Lys Ala Met Trp Arg Glu  
 340 345 350

Gly Arg Glu Cys Met Tyr Ile Glu Pro Asp Ser Lys Leu Lys Gly Val  
 355 360 365

Tyr Trp Tyr His Lys Leu  
 370

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 550 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
 (A) ORGANISMUS: *Vernonia galamensis*

(ix) MERKMAL:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
 (B) LAGE: 1..549

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CAT CAC GCC TTC AGT GAC TAT CAA TGG ATA GAC GAC ACT GTG GGC TTC	48
His His Ala Phe Ser Asp Tyr Gln Trp Ile Asp Asp Thr Val Gly Phe	
1 5 10 15	
ATC CTT CAC TTT GCA CTC TTC ACC CCT TAT TTC TCT TGG AAA TAC AGT	96
Ile Leu His Phe Ala Leu Phe Thr Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser	
20 25 30	
CAC CGT AAT CAC CAT GCC AAC ACA AAC TCT CTT GTA ACC GAT GAA GTA	144
His Arg Asn His His Ala Asn Thr Asn Ser Leu Val Thr Asp Glu Val	
35 40 45	
TAC ATC CCT AAA GTT AAA TCC AAG GTC AAG ATT TAT TCC AAA ATC CTT	192
Tyr Ile Pro Lys Val Lys Ser Lys Val Lys Ile Tyr Ser Lys Ile Leu	
50 55 60	
AAC AAC CCT CCT GGT CGC GTT TTC ACC TTG GCT TTC AGA TTG ATC GTG	240
Asn Asn Pro Pro Gly Arg Val Phe Thr Leu Ala Phe Arg Leu Ile Val	
65 70 75 80	
GGT TTT CCT TTA TAC CTT TTC ACC AAT GTT TCA GGC AAG AAA TAC GAA	288
Gly Phe Pro Leu Tyr Leu Phe Thr Asn Val Ser Gly Lys Lys Tyr Glu	
85 90 95	
CGT TTT GCC AAC CAT TTT GAT CCC ATG AGT CCC ATT TTC ACC GAG CGT	336
Arg Phe Ala Asn His Phe Asp Pro Met Ser Pro Ile Phe Thr Glu Arg	
100 105 110	

GAG CAT GTA CAA GTC TTG CTT TCT GAT TTT GGT CTC ATA GCA GTT GCT 384  
 Glu His Val Gln Val Leu Leu Ser Asp Phe Gly Leu Ile Ala Val Ala  
 115 120 125

TAC GTG GTT CGT CAA GCT GTA CTG GCT AAA GGA GGT GCT TGG GTG ATG 432  
 Tyr Val Val Arg Gln Ala Val Leu Ala Lys Gly Gly Ala Trp Val Met  
 130 135 140

TGC ATT TAC GGA GTT CCT GTG CTG GCC GTA AAC GCA TTC TTT GTT TTA 480  
 Cys Ile Tyr Gly Val Pro Val Leu Ala Val Asn Ala Phe Phe Val Leu  
 145 150 155 160

ATC ACT TAT CTT CAC CAC ACG CAT CTC TCA CTG CCC CAC TAT GAT AGC 528  
 Ile Thr Tyr Leu His His Thr His Leu Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser  
 165 170 175

TCA GAA TGG GAC TGG CTA CGA G 550  
 Ser Glu Trp Asp Trp Leu Arg  
 180

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 183 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

His His Ala Phe Ser Asp Tyr Gln Trp Ile Asp Asp Thr Val Gly Phe  
 1 5 10 15

Ile Leu His Phe Ala Leu Phe Thr Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser  
 20 25 30

His Arg Asn His His Ala Asn Thr Asn Ser Leu Val Thr Asp Glu Val  
 35 40 45

Tyr Ile Pro Lys Val Lys Ser Lys Val Lys Ile Tyr Ser Lys Ile Leu  
 50 55 60  
 Asn Asn Pro Pro Gly Arg Val Phe Thr Leu Ala Phe Arg Leu Ile Val  
 65 70 75 80  
 Gly Phe Pro Leu Tyr Leu Phe Thr Asn Val Ser Gly Lys Lys Tyr Glu  
 85 90 95  
 Arg Phe Ala Asn His Phe Asp Pro Met Ser Pro Ile Phe Thr Glu Arg  
 100 105 110  
 Glu His Val Gln Val Leu Leu Ser Asp Phe Gly Leu Ile Ala Val Ala  
 115 120 125  
 Tyr Val Val Arg Gln Ala Val Leu Ala Lys Gly Gly Ala Trp Val Met  
 130 135 140  
 Cys Ile Tyr Gly Val Pro Val Leu Ala Val Asn Ala Phe Phe Val Leu  
 145 150 155 160  
 Ile Thr Tyr Leu His His Thr His Leu Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser  
 165 170 175  
 Ser Glu Trp Asp Trp Leu Arg  
 180

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 177 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Crepis alpina

Lys Tyr Ser His Arg Asn His His Ala Asn Thr Asn Ser Leu Asp Asn  
 35 40 45

Asp Glu Val Tyr Ile Pro Lys Ser Lys Ala Lys  
 50 55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 383 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Arabidopsis thaliana

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Pro Val Pro Thr Ser Ser Lys Lys Ser  
 1 5 10 15

Glu Thr Asp Thr Thr Lys Arg Val Pro Cys Glu Lys Pro Pro Phe Ser  
 20 25 30

Val Gly Asp Leu Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Lys Arg Ser  
 35 40 45

Ile Pro Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Ile Ser Asp Ile Ile Ile Ala Ser  
 50 55 60

Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Asn Tyr Phe Ser Leu Leu Pro Gln Pro  
 65 70 75 80

Leu Ser Tyr Leu Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Cys Gln Gly Cys Val  
 85 90 95

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

LAGE: 1..177

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GAA TGC GGT CAC CAT GCC TTC AGC GAC TAC CAG TGG GTT GAC GAC AAT 48  
Glu Cys Gly His His Ala Phe Ser Asp Tyr Gln Trp Val Asp Asp Asn  
1 5 10 15

GTG GGC TTC ATC CTC CAC TCG TTT CTC ATG ACC CCG TAT TTC TCC TGG 96  
Val Gly Phe Ile Leu His Ser Phe Leu Met Thr Pro Tyr Phe Ser Trp  
20 25 30

AAA TAC AGC CAC CGG AAC CAC CAT GCC AAC ACA AAT TCG CTT GAC AAC 144  
Lys Tyr Ser His Arg Asn His His Ala Asn Thr Asn Ser Leu Asp Asn  
35 40 45

GAT GAA GTT TAC ATC CCC AAA AGC AAG GCC AAA 177  
Asp Glu Val Tyr Ile Pro Lys Ser Lys Ala Lys  
50 55

ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

LÄNGE: 59 Aminosäuren

ART: Aminosäure

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Protein

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Glu Cys Gly His His Ala Phe Ser Asp Tyr Gln Trp Val Asp Asp Asn  
1 5 10 15

Val Gly Phe Ile Leu His Ser Phe Leu Met Thr Pro Tyr Phe Ser Trp  
20 25 30

Leu Thr Gly Ile Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe  
 100 105 110

Ser Asp Tyr Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Phe His Ser  
 115 120 125

Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His  
 130 135 140

His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys  
 145 150 155 160

Gln Lys Ser Ala Ile Lys Trp Tyr Gly Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Leu  
 165 170 175

Gly Arg Ile Met Met Leu Thr Val Gln Phe Val Leu Gly Trp Pro Leu  
 180 185 190

Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Gly Phe Ala Cys  
 195 200 205

His Phe Phe Pro Asn Ala Pro Ile Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Leu Gln  
 210 215 220

Ile Tyr Leu Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Cys Phe Gly Leu Tyr  
 225 230 235 240

Arg Tyr Ala Ala Ala Gln Gly Met Ala Ser Met Ile Cys Leu Tyr Gly  
 245 250 255

Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Ala Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr Leu  
 260 265 270

Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp Asp  
 275 280 285

Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Leu  
 290 295 300



Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His Leu  
 305 310 315 320

Phe Ser Thr Met Pro His Tyr Asn Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala Ile  
 325 330 335

Lys Pro Ile Leu Gly Asp Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Trp Tyr  
 340 345 350

Val Ala Met Tyr Arg Glu Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro Asp  
 355 360 365

Arg Glu Gly Asp Lys Lys Gly Val Tyr Trp Tyr Asn Asn Lys Leu  
 370 375 380

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 384 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Brassica juncea

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Gln Val Ser Pro Ser Pro Lys Lys Ser  
 1 5 10 15

Glu Thr Asp Thr Leu Lys Arg Val Pro Cys Glu Thr Pro Pro Phe Thr  
 20 25 30

Val Gly Glu Leu Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Lys Arg Ser  
 35 40 45

Ile Pro Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Ile Trp Asp Ile Ile Val Ala Ser  
 50 55 60

Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Thr Tyr Phe Pro Leu Leu Pro His Pro  
 65 70 75 80

Leu Ser Tyr Val Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Cys Gln Gly Val Val  
 85 90 95

Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe  
 100 105 110

Ser Asp Tyr Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Phe His Ser  
 115 120 125

Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His  
 130 135 140

His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys  
 145 150 155 160

Lys Lys Ser Asp Ile Lys Trp Tyr Gly Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Leu  
 165 170 175

Gly Arg Thr Val Met Leu Thr Val Gln Phe Thr Leu Gly Trp Pro Leu  
 180 185 190

Tyr Trp Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Pro Glu Gly Phe Ala  
 195 200 205

Cys His Phe His Pro Asn Ala Pro Ile Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Leu  
 210 215 220

Gln Ile Tyr Val Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Cys Tyr Gly Leu  
 225 230 235 240

Tyr Arg Tyr Ala Ala Ala Gln Gly Val Ala Ser Met Val Cys Leu Tyr  
 245 250 255

Gly Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Ala Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr

260

265

270

Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp

275

280

285

Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile

290

295

300

Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His

305

310

315

320

Leu Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Val Thr Lys Ala

325

330

335

Ile Lys Pro Ile Leu Gly Asp Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Trp

340

345

350

Val Lys Ala Met Trp Arg Glu Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro

355

360

365

Asp Arg Gln Gly Glu Lys Lys Gly Val Phe Trp Tyr Asn Asn Lys Leu

370

375

380

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 383 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Glycine max

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Met Gly Ala Gly Gly Arg Thr Asp Val Pro Pro Ala Asn Arg Lys Ser  
 1 5 10 15

Glu Val Asp Pro Leu Lys Arg Val Pro Phe Glu Lys Pro Gln Phe Ser  
 20 25 30

Leu Ser Gln Ile Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Gln Arg Ser  
 35 40 45

Val Leu Arg Ser Phe Ser Tyr Val Val Tyr Asp Leu Thr Ile Ala Phe  
 50 55 60

Cys Leu Tyr Tyr Val Ala Thr His Tyr Phe His Leu Leu Pro Gly Pro  
 65 70 75 80

Leu Ser Phe Arg Gly Met Ala Ile Tyr Trp Ala Val Gln Gly Cys Ile  
 85 90 95

Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe  
 100 105 110

Ser Asp Tyr Gln Leu Leu Asp Asp Ile Val Gly Leu Ile Leu His Ser  
 115 120 125

Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His  
 130 135 140

His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys  
 145 150 155 160

Gln Lys Ser Cys Ile Lys Trp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Pro  
 165 170 175

Gly Arg Val Leu Thr Leu Ala Val Thr Leu Thr Leu Gly Trp Pro Leu  
 180 185 190

Tyr Leu Ala Leu Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Arg Phe Ala Cys  
 195 200 205

```

His Tyr Asp Pro Tyr Gly Pro Ile Tyr Ser Asp Arg Glu Arg Leu Gln
 210                215                220

Ile Tyr Ile Ser Asp Ala Gly Val Leu Ala Val Val Tyr Gly Leu Phe
225                230                235                240

Arg Leu Ala Met Ala Lys Gly Leu Ala Trp Val Val Cys Val Tyr Gly
      245                250                255

Val Pro Leu Leu Val Val Asn Gly Phe Leu Val Leu Ile Thr Phe Leu
      260                265                270

Gln His Thr His Pro Ala Leu Pro His Tyr Thr Ser Ser Glu Trp Asp
      275                280                285

Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Leu
      290                295                300

Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His Leu
305                310                315                320

Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala Ile
      325                330                335

Lys Pro Ile Leu Gly Glu Tyr Tyr Arg Phe Asp Glu Thr Pro Phe Val
      340                345                350

Lys Ala Met Trp Arg Glu Ala Arg Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro Asp
      355                360                365

Gln Ser Thr Glu Ser Lys Gly Val Phe Trp Tyr Asn Asn Lys Leu
      370                375                380

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 383 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Solanum commersonii

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Ser Ala Pro Asn Gly Glu Thr Glu Val  
 1 5 10 15

Lys Arg Asn Pro Leu Gln Lys Val Pro Thr Ser Lys Pro Pro Phe Thr  
 20 25 30

Val Gly Asp Ile Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Gln Arg Ser  
 35 40 45

Leu Ile Arg Ser Phe Ser Tyr Val Val Tyr Asp Leu Ile Leu Val Ser  
 50 55 60

Ile Met Tyr Tyr Val Ala Asn Thr Tyr Phe His Leu Leu Pro Ser Pro  
 65 70 75 80

Tyr Cys Tyr Ile Ala Trp Pro Ile Tyr Trp Ile Cys Gln Gly Cys Val  
 85 90 95

Cys Thr Gly Ile Trp Val Asn Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe  
 100 105 110

Ser Asp Tyr Gln Trp Val Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Leu His Ser  
 115 120 125

Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His  
 130 135 140

His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys  
 145 150 155 160

Pro Lys Ser Gln Leu Gly Trp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Pro  
 165 170 175

Gly Arg Val Leu Ser Leu Thr Ile Thr Leu Thr Leu Gly Trp Pro Leu  
 180 185 190

Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Arg Phe Ala Cys  
 195 200 205

His Tyr Asp Pro Tyr Gly Pro Ile Tyr Asn Asn Arg Glu Arg Leu Gln  
 210 215 220

Ile Phe Ile Ser Asp Ala Gly Val Leu Gly Val Cys Tyr Leu Leu Tyr  
 225 230 235 240

Arg Ile Ala Leu Val Lys Gly Leu Ala Trp Leu Val Cys Val Tyr Gly  
 245 250 255

Val Pro Leu Leu Val Val Asn Gly Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr Leu  
 260 265 270

Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp Asp  
 275 280 285

Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Cys Asp Arg Asp Tyr Gly Val Leu  
 290 295 300

Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Val His His Leu  
 305 310 315 320

Phe Ser Thr Met Pro His Tyr Asn Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala Val  
 325 330 335

Lys Pro Leu Leu Gly Asp Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Ile Tyr  
 340 345 350

Lys Glu Met Trp Arg Glu Ala Lys Glu Cys Leu Tyr Val Glu Lys Asp  
 355 360 365

Glu Ser Ser Gln Gly Lys Gly Val Phe Trp Tyr Lys Asn Lys Leu  
 370 375 380

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 387 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Glycine max

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Met Gly Leu Ala Lys Glu Thr Thr Met Gly Gly Arg Gly Arg Val Ala  
1 5 10 15

Lys Val Glu Val Gln Gly Lys Lys Pro Leu Ser Arg Val Pro Asn Thr  
20 25 30

Lys Pro Pro Phe Thr Val Gly Gln Leu Lys Lys Ala Ile Pro Pro His  
35 40 45

Cys Phe Gln Arg Ser Leu Leu Thr Ser Phe Ser Tyr Val Val Tyr Asp  
50 55 60

Leu Ser Phe Ala Phe Ile Phe Tyr Ile Ala Thr Thr Tyr Phe His Leu  
65 70 75 80

Leu Pro Gln Pro Phe Ser Leu Ile Ala Trp Pro Ile Tyr Trp Val Leu  
85 90 95

Gln Gly Cys Leu Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly  
100 105 110

His His Ala Phe Ser Lys Tyr Gln Trp Val Asp Asp Val Val Gly Leu  
115 120 125



Thr Leu His Ser Thr Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Ile Ser			
130	135	140	
His Arg Arg His His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Asp Arg Asp Glu Val			
145	150	155	160
Phe Val Pro Lys Pro Lys Ser Lys Val Ala Trp Phe Ser Lys Tyr Leu			
	165	170	175
Asn Asn Pro Leu Gly Arg Ala Val Ser Leu Leu Val Thr Leu Thr Ile			
	180	185	190
Gly Trp Pro Met Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp			
	195	200	205
Ser Phe Ala Ser His Tyr His Pro Tyr Ala Pro Ile Tyr Ser Asn Arg			
	210	215	220
Glu Arg Leu Leu Ile Tyr Val Ser Asp Val Ala Leu Phe Ser Val Thr			
225	230	235	240
Tyr Ser Leu Tyr Arg Val Ala Thr Leu Lys Gly Leu Val Trp Leu Leu			
	245	250	255
Cys Val Tyr Gly Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Gly Phe Leu Val Thr			
	260	265	270
Ile Thr Tyr Leu Gln His Thr His Phe Ala Leu Pro His Tyr Asp Ser			
	275	280	285
Ser Glu Trp Asp Trp Leu Lys Gly Ala Leu Ala Thr Met Asp Arg Asp			
	290	295	300
Tyr Gly Ile Leu Asn Lys Val Phe His His Ile Thr Asp Thr His Val			
305	310	315	320
Ala His His Leu Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala			
	325	330	335

Thr Asn Ala Ile Lys Pro Ile Leu Gly Glu Tyr Tyr Gln Phe Asp Asp  
 340 345 350  
 Thr Pro Phe Tyr Lys Ala Leu Trp Arg Glu Ala Arg Glu Cys Leu Tyr  
 355 360 365  
 Val Glu Pro Asp Glu Gly Thr Ser Glu Lys Gly Val Tyr Trp Tyr Arg  
 370 375 380  
 Asn Lys Tyr  
 385

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 387 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Ricinus communis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Met Gly Gly Gly Gly Arg Met Ser Thr Val Ile Thr Ser Asn Asn Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Lys Gly Gly Ser Ser His Leu Lys Arg Ala Pro His Thr Lys  
 20 25 30  
 Pro Pro Phe Thr Leu Gly Asp Leu Lys Arg Ala Ile Pro Pro His Cys  
 35 40 45  
 Phe Glu Arg Ser Phe Val Arg Ser Phe Ser Tyr Val Ala Tyr Asp Val  
 50 55 60

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

Ile Thr Tyr Leu Gln His Thr His Pro Ala Ile Pro Arg Tyr Gly Ser  
 275 280 285

Ser Glu Trp Asp Trp Leu Arg Gly Ala Met Val Thr Val Asp Arg Asp  
 290 295 300

Tyr Gly Val Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Ala Asp Thr His Val  
 305 310 315 320

Ala His His Leu Phe Ala Thr Val Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala  
 325 330 335

Thr Lys Ala Ile Lys Pro Ile Met Gly Glu Tyr Tyr Arg Tyr Asp Gly  
 340 345 350

Thr Pro Phe Tyr Lys Ala Leu Trp Arg Glu Ala Lys Glu Cys Leu Phe  
 355 360 365

Val Glu Pro Asp Glu Gly Ala Pro Thr Gln Gly Val Phe Trp Tyr Arg  
 370 375 380

Asn Lys Tyr  
 385

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
  - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (v) ART DES FRAGMENTS: intern
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

His Glu Cys Gly His His  
 1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

**His Arg Asn His His**

**1 5**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: intern

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

**His Val Met His His**

**1 5**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Oligonucleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

TCGAATTCCY TBMGNNNNYT SGGNHTBGG

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 1610 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Euphorbia lagascae

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 8..1546

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

AGTAACA ATG AAC ACT AAG GAG AAG AAG AAG AAC AGG GTT TCT AAC

49

Met Asn Thr Lys Glu Lys Lys Lys Lys Asn Arg Val Ser Asn

1

5

10

ATG TCT ATT CTT CTT TGC TTC CTT TGC CTT CTT CCA GTT TTC CTT GTT

97

Met Ser Ile Leu Leu Cys Phe Leu Cys Leu Leu Pro Val Phe Leu Val

15

20

25

30

TCT CTT TCT ATT CTT TCT AAG AGG CTT AAG CCA TCT AAG TGG AAG CTT	145
Ser Leu Ser Ile Leu Ser Lys Arg Leu Lys Pro Ser Lys Trp Lys Leu	
35 40 45	
CCA CCA GGA CCA AAG ACT CTT CCA ATT ATT GGA AAC CTT CAA GAT GAG	193
Pro Pro Gly Pro Lys Thr Leu Pro Ile Ile Gly Asn Leu Gln Asp Glu	
50 55 60	
AGG CAA GAT CCA GAG GCT TCT CTT TCT CAA GGA CAT ATT GCT AGG GGA	241
Arg Gln Asp Pro Glu Ala Ser Leu Ser Gln Gly His Ile Ala Arg Gly	
65 70 75	
CCA GTT GTT CAT TGC GAG AAG CTT GAG TCT TTC GGA ACT CAA CCA ACT	289
Pro Val Val His Cys Glu Lys Leu Glu Ser Phe Gly Thr Gln Pro Thr	
80 85 90	
ATT AAG GTT GGA CAT TAT GAT AAG AAC TGC GCT CTT CTT CAT GGA GCT	337
Ile Lys Val Gly His Tyr Asp Lys Asn Cys Ala Leu Leu His Gly Ala	
95 100 105 110	
GGA GAT GAG CTT CTT GGA AAG CCA TCT CCA CCA AAC GAT GCT TGG GAT	385
Gly Asp Glu Leu Leu Gly Lys Pro Ser Pro Pro Asn Asp Ala Trp Asp	
115 120 125	
ACT GGA GGA TAT GGA CTT GAG AGG TCT AAG AAC GAG AGG TGG AAG GAG	433
Thr Gly Gly Tyr Gly Leu Glu Arg Ser Lys Asn Glu Arg Trp Lys Glu	
130 135 140	
AAG GAG ACT TGG TCT GCT TTC AGG CAA TAT AGG ACT CTT AGG GCT TTC	481
Lys Glu Thr Trp Ser Ala Phe Arg Gln Tyr Arg Thr Leu Arg Ala Phe	
145 150 155	
GGA ATG GGA GGA AGG TCT TTC GAG CTT ATG AGG TGG CAA GAG GCT CAT	529
Gly Met Gly Gly Arg Ser Phe Glu Leu Met Arg Trp Gln Glu Ala His	
160 165 170	
TGC CTT GTT GAT GGA TAT GTT TCT AGG AAG GCT TCT GGA ACT GAT CCA	577
Cys Leu Val Asp Gly Tyr Val Ser Arg Lys Ala Ser Gly Thr Asp Pro	
175 180 185 190	

ACT AAG GAT CTT GAG GAT TCT AGG TTC AAC ATT ATT ATG GGA GCT ACT	625
Thr Lys Asp Leu Glu Asp Ser Arg Phe Asn Ile Ile Met Gly Ala Thr	
195 200 205	
TTC AAC CAA GGA CTT GAT TAT AAG ATT AAG ACT TTC CTT GAT AGG CAT	673
Phe Asn Gln Gly Leu Asp Tyr Lys Ile Lys Thr Phe Leu Asp Arg His	
210 215 220	
GAG AGG AGG AAC TTC CAA TTC AAC AAC GTT GAT GCT GTT TAT CAT CAA	721
Glu Arg Arg Asn Phe Gln Phe Asn Asn Val Asp Ala Val Tyr His Gln	
225 230 235	
ATG AAG GAT GCT GAG AGG GGA TTC GTT GAT TCT AGG GGA TGG CAA GAT	769
Met Lys Asp Ala Glu Arg Gly Phe Val Asp Ser Arg Gly Trp Gln Asp	
240 245 250	
GAG TTC GGA ATT GCT CTT CAA CAA GTT GTT GCT CAA ATT CTT GAT AAG	817
Glu Phe Gly Ile Ala Leu Gln Gln Val Val Ala Gln Ile Leu Asp Lys	
255 260 265 270	
CCA CTT GAT CAT CAA AAG GCT CTT GAG AGG TGG CAA CCA AGG GAT TCT	865
Pro Leu Asp His Gln Lys Ala Leu Glu Arg Trp Gln Pro Arg Asp Ser	
275 280 285	
CTT AAC CAT TTC ATT GGA GCT AGG GAT GAT GAG ATG GTT CAA ATT AAG	913
Leu Asn His Phe Ile Gly Ala Arg Asp Asp Glu Met Val Gln Ile Lys	
290 295 300	
TAT GAT TTC TGC AAG GAT GCT CTT AGG ATG TTC GAT ACT GGA ATT CTT	961
Tyr Asp Phe Cys Lys Asp Ala Leu Arg Met Phe Asp Thr Gly Ile Leu	
305 310 315	
GCT GCT GAT CTT CAA TCT TCT ACT TCT TCT ATT AGG TGG GAG CCA ATT	1009
Ala Ala Asp Leu Gln Ser Ser Thr Ser Ser Ile Arg Trp Glu Pro Ile	
320 325 330	
GTT GTT ATG CTT CAA GCT GAG GTT AAG GGA GAG ATT TGC GAG GAG CTT	1057
Val Val Met Leu Gln Ala Glu Val Lys Gly Glu Ile Cys Glu Glu Leu	
335 340 345 350	



GAT AGG GTT ATT GCT AGG CAT CAA AGG CCA TCT ATG AAG GAT AAG ATG	1105
Asp Arg Val Ile Ala Arg His Gln Arg Pro Ser Met Lys Asp Lys Met	
355 . 360 365	
 GTT AAG AGG TAT ACT GCT GCT GTT GTT TGC GAG CTT GAT AGG TAT GCT	1153
Val Lys Arg Tyr Thr Ala Ala Val Val Cys Glu Leu Asp Arg Tyr Ala	
370 375 380	
 AAG CTT CTT CCA TCT TCT CTT AGG TGC GTT GCT GCT GAT GAG TGG AAG	1201
Lys Leu Leu Pro Ser Ser Leu Arg Cys Val Ala Ala Asp Glu Trp Lys	
385 390 395	
 TTC AGG GAG TAT CTT ATT CCA GTT GGA ATG ACT GTT GGA AAC CTT AAG	1249
Phe Arg Glu Tyr Leu Ile Pro Val Gly Met Thr Val Gly Asn Leu Lys	
400 405 410	
 ACT ACT GTT ATG CTT GAT CAA AAG GAT CCA GTT GAT CCA GAG CTT TTC	1297
Thr Thr Val Met Leu Asp Gln Lys Asp Pro Val Asp Pro Glu Leu Phe	
415 420 425 430	
 GAT GGA ATG TAT GGA CTT GAT GCT GAG GTT CAT TTC GAT AAG ACT GAT	1345
Asp Gly Met Tyr Gly Leu Asp Ala Glu Val His Phe Asp Lys Thr Asp	
435 440 445	
 AGG TTC ATG CCA CCA TTC TCT GCT GGG AGG ATT GCC TGC GCT GGA CAA	1393
Arg Phe Met Pro Pro Phe Ser Ala Gly Arg Ile Ala Cys Ala Gly Gln	
450 455 460	
 CTT CTT GCT GCT TAT GAG CTT TTC CTT TTC TTC TGG ACT ATT GCT GAT	1441
Leu Leu Ala Ala Tyr Glu Leu Phe Leu Phe Phe Trp Thr Ile Ala Asp	
465 470 475	
 GTT TTC CAA ATT TTC TCT CTT GCT CAA TTC AAG GAG GGA CAT TGC ACT	1489
Val Phe Gln Ile Phe Ser Leu Ala Gln Phe Lys Glu Gly His Cys Thr	
480 485 490	
 GCT GTT ACT CTT ATT ATT GAT TGC CTT GCT GTT AGG TAT GAT CTT TGC	1537
Ala Val Thr Leu Ile Ile Asp Cys Leu Ala Val Arg Tyr Asp Leu Cys	
495 500 505 510	

CTT GCT AGG TAGGGACCTT TACCGTTTGT GTGACCGTGT CAATGCTTGC 1586  
 Leu Ala Arg

AA<sup>7</sup>GGGCTTT TAATAATATT ATTA 1610

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1698 Basenpaare
- (B) ART: Nucleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 8..1504

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

GAGAACA ATG GCA CAA TTC GGC ACG AGG GAA ATT CTA GTC TCA CTC TTT 49  
 Met Ala Gln Phe Gly Thr Arg Glu Ile Leu Val Ser Leu Phe  
 1 5 10

CTC TTT CTA ATA CTA ATA AAG TTC ACA TTT TTA AAA CTC AAA ACC CCC 97  
 Leu Phe Leu Ile Leu Ile Lys Phe Thr Phe Leu Lys Leu Lys Thr Pro  
 15 20 25 30

CAA AAC CTC CCC CCA TCA CCA CCA TCT TTT CCA ATC ACC GGC CAT CTC 145  
 Gln Asn Leu Pro Pro Ser Pro Pro Ser Phe Pro Ile Thr Gly His Leu  
 35 40 45

CAT CTC CTA AAA CAA CCA ATC CAC AGA ACT CTC CAC CAA ATC GCC ACC 193  
 His Leu Leu Lys Gln Pro Ile His Arg Thr Leu His Gln Ile Ala Thr  
 50 55 60

AAG TAC GGG CAC ATC TTA TTC CTC CGA TTC GGA ACA CGA AAA GTC CTA 241  
 Lys Tyr Gly Asp Ile Leu Phe Leu Arg Phe Gly Thr Arg Lys Val Leu  
 65 70 75

GTC ATC TCC TCT CTC CCC GCC GTA CAA GAA TGT TTC ACT ATA AAC GAC 289  
 Val Ile Ser Ser Leu Pro Ala Val Gln Glu Cys Phe Thr Ile Asn Asp  
 80 85 90

ATC ATT TTC GCT AAC CGC CCA ACA ATT CTC GCC GGG AAG CAC CTC AAT 337  
 Ile Ile Phe Ala Asn Arg Pro Thr Ile Leu Ala Gly Lys His Leu Asn  
 95 100 105 110

TAC AAT TCC ACC ACC ATG GGA TTC GCC TCC TAT GGC GAT CAC TGG CGT 385  
 Tyr Asn Ser Thr Thr Met Gly Phe Ala Ser Tyr Gly Asp His Trp Arg  
 115 120 125

CAT CTC CGA CGA CTC ACA ACA ATT GAG CTC TTC TCT GCA AAT CGT GTT 433  
 His Leu Arg Arg Leu Thr Thr Ile Glu Leu Phe Ser Ala Asn Arg Val  
 130 135 140

GCC ATG TTT TCC GGG TTC CGG GCC GAT GAA AGT ACA GCT TTT TAT CAA 481  
 Ala Met Phe Ser Gly Phe Arg Ala Asp Glu Ser Thr Ala Phe Tyr Gln  
 145 150 155

ACA GTT GTT CCA GGA AAT CGG GAT TCG GGA AAG ATA GTA ACT TTG ACA 529  
 Thr Val Val Pro Gly Asn Arg Asp Ser Gly Lys Ile Val Thr Leu Thr  
 160 165 170

TCG AAA CTG ATG GAG CTT ACA CTG AAT AAC ATA ATG AGA ATG GCT GCC 577  
 Ser Lys Leu Met Glu Leu Thr Leu Asn Asn Ile Met Arg Met Ala Ala  
 175 180 185 190

GGA AAA CGG TTT TAC GGG AAA GAA GTG AAG GAT GAA GAA GCT GAG TTG 625  
 Gly Lys Arg Phe Tyr Gly Lys Glu Val Lys Asp Glu Glu Gly Glu Leu  
 195 200 205

TTG CAG GAT CTT ATG AAG AAA ATG GAG GCG CTC CGG GGG AAT TCA ACG	673
Leu Gln Asp Leu Met Lys Lys Met Glu Ala Leu Arg Gly Asn Ser Thr	
210 215 220	
GTG AAA CGA GAT TAT TTT CCA GTA TTG CAG TGG ATT GAT TAT CAG GGA	721
Val Lys Arg Asp Tyr Phe Pro Val Leu Gln Trp Ile Asp Tyr Gln Gly	
225 230 235	
GTA AAG AAG AAG ATG AGG AAC CTG ATG AAG AAA ATG GAC GGG TTC TTG	769
Val Lys Lys Lys Met Arg Asn Leu Met Lys Lys Met Asp Gly Phe Leu	
240 245 250	
CAA AAT CTC ATT GAT GAA CAC CGA AAC ACG ACG TTG TGG ATC AAT CAA	817
Gln Asn Leu Ile Asp Glu His Arg Asn Thr Thr Leu Trp Ile Asn Gln	
255 260 265 270	
GTT CGA GCA ACT CGG ACA AAA AGA GGA ACT TGG ACA CTG GTA GAT GTT	865
Val Arg Ala Thr Arg Thr Lys Arg Gly Thr Trp Thr Leu Val Asp Val	
275 280 285	
ATG TTG AAT CTT AAA AAG ACA CAA CCT GAC TTC TAC ACT GAT CTA ACT	913
Met Leu Asn Leu Lys Lys Thr Gln Pro Asp Phe Tyr Thr Asp Leu Thr	
290 295 300	
ATC AAA GGT GTC ATT CAG ACA ACA CTG ACT GCA GGA TCT CAA ACG TCA	961
Ile Lys Gly Val Ile Gln Thr Thr Leu Thr Ala Gly Ser Gln Thr Ser	
305 310 315	
GCA GTT ACA CTA GAA TGG GCG CTG TCA CTT CTT CTC AAC CAT CCT CAA	1009
Ala Val Thr Leu Glu Trp Ala Leu Ser Leu Leu Leu Asn His Pro Gln	
320 325 330	
GTA ATG CAC AAA GCT TAT GCC GAA ATA GAG GCG ATT GTC GGG ACC AAC	1057
Val Met His Lys Ala Tyr Ala Glu Ile Glu Ala Ile Val Gly Thr Asn	
335 340 345 350	
CGC TTA TTA AAC GAA GCC GAC TTA CCA CAT CTA AGC TAT TTA CAA AAC	1105
Arg Leu Leu Asn Glu Ala Asp Leu Pro His Leu Ser Tyr Leu Gln Asn	
355 360 365	

ATA ATC ACC GAG ACA TTT CGA CTC TTC CCA CCA GTA CCA CTT TTA CTA	1153
Ile Ile Thr Glu Thr Phe Arg Leu Phe Pro Pro Val Pro Leu Leu Leu	
370 375 380	
CCC CAT AAA TCA TCA GCA GAT TGC ATA GTT TCC GGG TTT CAC ATA CCA	1201
Pro His Lys Ser Ser Ala Asp Cys Ile Val Ser Gly Phe His Ile Pro	
385 390 395	
CGG GGC ACA ATG TTG CTA GTG AAC ACA TGG AGC ATG AAT AGA AAT CCA	1249
Arg Gly Thr Met Leu Leu Val Asn Thr Trp Ser Met Asn Arg Asn Pro	
400 405 410	
ACA TTA TGG AAG GAA CCA GAG AAA TTC ATA CCA GAA AGA TTT GAA GGA	1297
Arg Leu Trp Lys Glu Pro Glu Lys Phe Ile Pro Glu Arg Phe Glu Gly	
415 420 425 430	
GGA GAA AAT ACT GAA GGG TGT AAC TAT AAA TTG CTT CCT TTC GGT GCA	1345
Gly Glu Asn Thr Glu Gly Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Pro Phe Gly Ala	
435 440 445	
GGA AGG CGG GCT TGT CCG GGG GCC GGT GTG GCG AAA CGA ATG GTA GGA	1393
Gly Arg Arg Ala Cys Pro Gly Ala Gly Val Ala Lys Arg Met Val Gly	
450 455 460	
CTC ACT TTA GGT GCA TTG ATT CAG TGT TTT GAG TGG GAA AGA ATT GGG	1441
Leu Thr Leu Gly Ala Leu Ile Gln Cys Phe Glu Trp Glu Arg Ile Gly	
465 470 475	
GAA GAA GAA ATA GAT TTG AGT GAA GGA ACA GGT CTT ACT ATG CCA AAA	1489
Glu Glu Glu Ile Asp Leu Ser Glu Gly Thr Gly Leu Thr Met Pro Lys	
480 485 490	
GAT TTC CTT TGG AAG TAATATGCAA ACCTCGGCAA AACATGATTA ACTTTCTTTC	1544
Asp Phe Leu Trp Lys	
495	
TACATTGTTA TAAAAGGTGG GTTCTTTTGC AGGTGCCAAC CCTAATTCAA ATATCGCATT	1604
TTTTCCCTGC AACCCAGCTG CTAACCAAAT ATCACTGTTT CTCATTATTC CTTATATAAA	1664
ACCTTAAAGC ACTATTTGCC TCCTAAAAAA AAAA	1698

### Patentansprüche

1. Isoliertes Nucleinsäuremolekül, das eine Epoxygenase codiert oder komplementär zu einem eine Epoxygenase codierenden isolierten Nucleinsäuremolekül ist, wobei die Epoxygenase ein Monooxygenasepolypeptid gemischter Funktion ist, das zur Katalyse der Epoxygenierung einer Kohlenstoffbindung in einem Fettsäuremolekül fähig ist, wobei die Epoxygenase eine Aminosäuresequenz mit den drei histidinreichen Motiven: (i) His-(Xaa)<sub>3-4</sub>-His,

- (ii) His-(Xaa)<sub>2-3</sub>-His-His und
- (iii) His-(Xaa)<sub>2-3</sub>-His-His umfasst.

2. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die Kohlenstoffbindung eine Doppelbindung in einem ungesättigten Fettsäuremolekül ist.

3. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Epoxygenase ein  $\Delta 6$ -Epoxygenaseenzym,  $\Delta 9$ -Epoxygenaseenzym,  $\Delta 12$ -Epoxygenaseenzym oder  $\Delta 15$ -Epoxygenaseenzym ist.

4. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das von einer Pflanze abgeleitet ist.

5. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 4, wobei die Pflanze aus der Liste, die *Crepis* spp., *Euphorbia* spp., *Chrysanthemum* spp. und *Vernonia* spp. umfasst, ausgewählt ist.

6. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 4, wobei die Pflanze hohe Konzentrationen an Vernolsäure produziert.

7. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5, wobei die Pflanze aus der Liste, die *Crepis biennis*, *Crepis aurea*, *Crepis conyzaeifolia*, *Crepis intermedia*, *Crepis occidentalis*, *Crepis palaestina*, *Crepis vesicaria*, *Crepis xacintha* und *Vernonia galamensis* umfasst, ausgewählt ist.

8. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die zu mindestens etwa 65 % identisch mit einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 oder einer zu diesen komplementären Sequenz ist.

9. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 8, das zur Hybridisierung unter Bedingungen einer mindestens mäßigen Stringenz mit mindestens 20 fortlaufenden Nucleotiden, die in einer der Sequenzen SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 oder einer zu diesen komplementären Sequenz enthalten sind, fähig ist.

10. Isoliertes Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 9, das die in SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 angegebene Nucleotidsequenz oder eine zu diesen komplementäre Nucleotidsequenz oder mindestens 20 fortlaufende Nucleotide derselben umfasst.

11. Genkonstrukt, das das isolierte Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10 funktional mit einer Promotorsequenz verbunden umfasst, wobei das Nucleinsäuremolekül in Sense- oder Antisense-Orientierung, bezogen auf die Richtung der In-vivo-Transkription eines natürlich vorkommenden Epoxygenasegens einer Monooxygenase gemischter Funktion, transkribiert werden kann.

12. Verfahren zur Änderung der Konzentrationsmenge von Epoxyfettsäuren in einer Zelle, einem Gewebe, Organ, nichthumanen Organismus oder Mikroorganismus, wobei das Verfahren die Einführung eines Sense-, Antisense-, Ribozym- oder Cosuppressionsmoleküls, das das isolierte Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10 umfasst, in eine Zelle, ein Gewebe, Organ oder einen nichthumanen Organismus und die Inkubation der Zelle über einen Zeitraum und unter Bedingungen, die so ausreichend sind, dass eine Expression des Sense-, Antisense-, Ribozym- oder Cosuppressionsmoleküls erfolgt, umfasst.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die Stufe der Einführung des Sense-, Antisense-, Ribozym- oder Cosuppressionsmoleküls eine stabile Transformation der Zelle, des Gewebes, Organs oder nichthumanen Organismus mit dem Sense-, Antisense-, Ribozym- oder Cosuppressionsmolekül umfasst.

14. Verfahren zur Produktion eines rekombinanten, enzymatisch aktiven Epoxygenasepolypeptids einer Monooxygenase gemischter Funktion in einer Zelle, wobei das Verfahren das Kultivieren einer Zelle, die das isolierte Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10 umfasst, über einen Zeitraum und unter Bedingungen, die so ausreichend sind, dass eine Expression erfolgt, umfasst.

15. Verfahren nach Anspruch 14, das die zusätzliche erste Stufe einer Transformation der Zelle mit dem isolierten Nucleinsäuremolekül umfasst.

16. Verfahren zur Produktion eines rekombinanten, enzymatisch aktiven Epoxygenasepolypeptids einer Monooxygenase gemischter Funktion in einer Zelle, wobei das Verfahren die folgenden Stufen umfasst:

- (i) Produzieren eines Genkonstrukts, das das isolierte Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis

- 10, das funktional unter die Kontrolle eines Promotors mit der Fähigkeit, die Expression der Gensequenz in der Zelle zu bewirken, und optional eines Expression-Enhancerelements gestellt wurde, umfasst;
- (ii) Transformieren des Genkonstrukts in die Zelle und
- (iii) Selektieren von Transformanten, die eine durch die Gensequenz codierte funktionale Epoxygenase in hohem Grade exprimieren.
17. Verfahren zur Produktion eines rekombinanten, enzymatisch aktiven Epoxygenasepolypeptids einer Monooxygenase gemischter Funktion in einer transgenen Pflanze, wobei das Verfahren die folgenden Stufen umfasst:
- (i) Produzieren eines Genkonstrukts, das das isolierte Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10, das funktional unter die Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und optional eines Expression-Enhancerelements gestellt wurde, umfasst, wobei die Gensequenzen auch strangaufwärts einer Transkriptionsterminatorsequenz platziert wurden;
- (ii) Transformieren des Genkonstrukts in eine Zelle oder ein Gewebe der Pflanze; und
- (iii) Selektieren von Transformanten, die eine durch die Gensequenz codierte funktionale Epoxygenase in hohem Grade in Samen exprimieren.
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Pflanze eine Ölsamenart ist, die normalerweise hohe Konzentrationen an Linolsäure produziert.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 oder 18, wobei die Pflanze aus der Liste, die Linola®-Flachs, Ölraps, Sonnenblume, Saflor, Sojabohne, Leinsamen, Sesam, Baumwollsaamen, Erdnuss, Ölbaum oder Ölpalme umfasst, ausgewählt ist.
20. Rekombinantes Epoxygenasepolypeptid einer Monooxygenase gemischter Funktion, das gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 19 produziert wurde.
21. Rekombinantes Epoxygenasepolypeptid einer Monooxygenase gemischter Funktion nach Anspruch 20, das eine Aminosäuresequenz umfasst, die in einer der Sequenzen SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 angegeben ist oder die zu mindestens etwa 50 % mit diesen identisch ist.
22. Verfahren zur Produktion einer epoxygenierten Fettsäure in einer Zelle, einem Gewebe, Organ, nicht-humanen Organismus oder Mikroorganismus, wobei das Verfahren das Inkubieren einer Zelle, eines Gewebes, Organs oder eines nichthumanen Organismus, die das rekombinante Polypeptid nach Anspruch 20 oder 21 exprimieren, mit einem Fettsäuresubstrat über einen Zeitraum und unter Bedingungen, die so ausreichend sind, dass mindestens eine Kohlenstoffbindung des Substrats in eine Epoxygruppe umgewandelt wird, umfasst.
23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das Fettsäuresubstrat eine ungesättigte Fettsäure ist und die Kohlenstoffbindung des Substrats, die epoxygeniert wird, eine Kohlenstoffdoppelbindung ist.
24. Verfahren nach Anspruch 22 oder 23, wobei das Fettsäuresubstrat aus der Liste, die Palmitoleinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure, 9,15-Octadecadiensäure und Arachidonsäure umfasst, ausgewählt ist.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 24, wobei die Kohlenstoffbindung, die epoxygeniert wird, eine  $\Delta 6$ -Kohlenstoffbindung oder  $\Delta 9$ -Kohlenstoffbindung oder  $\Delta 12$ -Kohlenstoffbindung oder  $\Delta 15$ -Kohlenstoffbindung ist.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 25, wobei die epoxygenierte Fettsäure, die produziert wird, Vernolsäure ist.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 26, das die zusätzliche erste Stufe der Transformation oder Transfektion der Zelle, des Gewebes, Organs oder nichthumanen Organismus mit einem Nucleinsäuremolekül, das die rekombinante Epoxygenase einer Monooxygenase gemischter Funktion codiert, umfasst.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 bis 27, wobei die Zelle, das Organ, Gewebe oder der nicht-humane Organismus, in denen die rekombinante Epoxygenase einer Monooxygenase gemischter Funktion exprimiert wird, von einem Bakterium, einer Hefe, einem Pilz, einem Schimmelpilz, Insekt, einer Pflanze, einem Vogel oder einem nichthumanen Säuger stammt.

29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Hefe, Pflanze, der Pilz oder Schimmelpilz eine ölhaltige Hefe, Pflanze, ein ölhaltiger Pilz oder Schimmelpilz ist.

30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei die Pflanze eine Ölsaatzpflanze ist, die die rekombinante Epoxygenase einer Monooxygenase gemischter Funktion normalerweise nicht in hohem Grade exprimiert.

31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die Ölsaatzpflanze aus der Liste, die Linola®-Flachs, Ölrap, Sonnenblume, Saflor, Sojabohne, Leinsamen, Sesam, Baumwollsaamen, Erdnuss, Ölbaum oder Ölpalme umfasst, ausgewählt ist.

32. Pflanze, die mit dem isolierten Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10 transformiert ist, oder eine Zelle, ein Gewebe oder Organ, die davon abgeleitet sind, oder Nachkommen der Pflanze, die ebenfalls das Nucleinsäuremolekül umfassen.

33. Transformierte Pflanze, die zur Expression des rekombinanten Polypeptids nach den Ansprüchen 20 oder 21 fähig ist, oder eine Zelle, ein Gewebe oder Organ, die davon abgeleitet sind, oder die Nachkommen der Pflanze, die ebenfalls zur Expression des rekombinanten Polypeptids fähig sind.

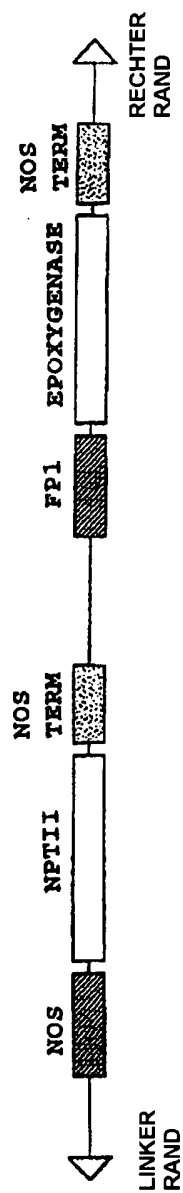
34. Pflanze oder eine Zelle, ein Gewebe oder Organ, die davon abgeleitet sind, oder Nachkommen derselben nach den Ansprüchen 32 oder 33, die bzw. das Linola®-Flachs, Ölrap, Sonnenblume, Saflor, Sojabohne, Leinsamen, Sesam, Baumwollsaamen, Erdnuss, Ölbaum oder Ölpalme ist oder davon abgeleitet ist.

35. Pflanze oder eine Zelle, ein Gewebe oder Organ, die davon abgeleitet sind, oder Nachkommen derselben nach Anspruch 32 oder 33, die bzw. das *Arabidopsis thaliana* oder *Linum usitatissimum* ist oder davon abgeleitet ist.

Es folgen 23 Blatt Zeichnungen



Anhängende Zeichnungen



FIGUR 1

**FIGUR 2A**

**FIGUR 2B**

	101						150
Cpal2	FCQASVLTGL	WILGHECGHH	AFSNYTWEDD	TVGFILHSFL	LTPYFSWKFS		
CrepX	FCQASVLTGL	WILGHECGHH	AYSNTWVDD	TVGFILHSFL	LTPYFSWKYS		
Vgal1	.....	.....HH	AFSDYQWIDD	TVGFILHFAL	FTPYFSWKYS		
Crep1	FCQASILTGL	WVIGHECGHH	AFSDYQWVDD	TVGFILHSFL	MTPYFSWKYS		
L26296	ACQGCVLTI	WVIAHECGHH	AFSDYQWLDD	TVGLIFHSFL	LVPYFSWKYS		
X91139	ACQGVVLTGV	WVIAHECGHH	AFSDYQWLDD	TVGLIFHSFL	LVPYFSWKYS		
L43921	AVQGCILTV	WVIAHECGHH	AFSDYQLDD	IVGLILHSAL	LVPYFSWKYS		
X92847	ICQGCVCTGI	WVNAHECGHH	AFSDYQWVDD	TVGLILHSAL	LVPYFSWKYS		
L43920	VLQGCLLTV	WVIAHECGHH	AFSKYQWVDD	VVGLTLHSTL	LVPYFSWKIS		
U22378	LFQGCILTV	WVIGHECGHH	AFSEYQLADD	IVGLIVHSAL	LVPYFSWKYS		

FIGUR 2C

**FIGUR 2D**

	201		250
Cpal2	PLYLLTNISG	KKY.DRFANH	FDPMSPIFKE RERFQVFLSD LGLLAVFYGI
CrepX	PLYLLTNISG	KKY.DRFANH	FDPMSPIFKE RERFQVFLSD LGLLAVFYGI
Vgal1	PLYLFTNVSG	KKY.ERFANH	FDPMSPIFTE REHVQVLLSD FGLIAVAYVV
Crep1	PLYLFTNVSG	KKY.ERFANH	FDPMSPIFKE RERFQVLLSD LGLLAVLYGV
L26296	PLYLAFNVSG	RPY.DGFACH	FFPNAPIYND RERLQIYLSG AGILAVCFGL
X91139	PLYWAFNVSG	RPYPEGFACH	FHPNAPIYND RERLQIYVSD AGILAVCYGL
L43921	PLYLALNVSG	RPY.DRFACH	YDPYGGPIYSD RERLQIYISD AGVLAVVYGL
X92847	PLYLAFNVSG	RPY.DRFACH	YDPYGGPIYNN RERLQIFISD AGVLGVCYLL
L43920	PMYLAFNVSG	RPY.DSFASH	YHPYAPIYSN RERLLIYVSD VALFSVTYSL
U22378	PLYLAFNVSG	RPY.DRFACH	YDPYGGPIFSE RERLQIYIAD LGIFATTFVL

FIGUR 2E

**FIGUR 2F**

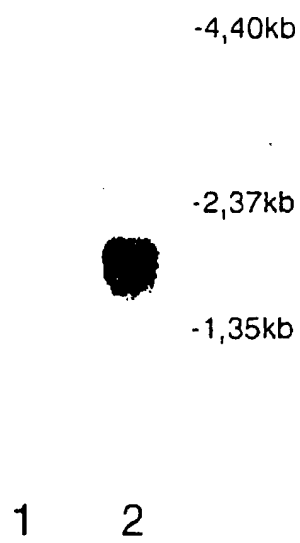
Cpal2	301	IRGALSAIDR	DFGFLNSVFX	DVTHTHVMHH	LFSYIPHYHA	KEARDAIKPI	350
CrepX		IRGALSAIDR	DFGFLNSVFX	DVTHTHVMHH	LFSYIPHYHA	KEARDAIKPI	
Vgal1		LR.....	.....	.....	.....	.....	
Crep1		LRGALSTIDR	DFGFLNSVLH	DVTHTHVMHH	LFSYIPHYHA	KEARDAINTV	
L26296		LRGALATVDR	DYGILNKVFX	NITDTHVAHH	LFSTMPHYNA	MEATKAIKPI	
X91139		LRGALATVDR	DYGILNKVFX	NITDTHVAHH	LFSTMPHYHA	MEVTKAIKPI	
L43921		LRGALATVDR	DYGILNKVFX	NITDTHVAHH	LFSTMPHYHA	MEATKAIKPI	
X92847		LRGALATCDR	DYGVNLKVFX	NITDTHVVHH	LFSTMPHYNA	MEATKAVKPL	
L43920		LKGALATMDR	DYGILNKVFX	HITDTHVAHH	LFSTMPHYHA	MEATNAIKPI	
U22378		LRGAMVTVDR	DYGVNLKVFX	NIADTHVAHH	LFATVPHYHA	MEATKAIKPI	

FIGUR 2G



	351						394
Cpal2	LGDFYIMIDRT	PILKAMWREG	RECMYIEPDS	..KLKGVYWY	.HKL		
CrepX	LGDFYIMIDRT	PILKAMWREG	RECMYIEPDS	..KLKGVYWY	.HKL		
Vgal1	.....	.....	.....	.....	....		
Crep1	LGDFYKIDRT	PILKAMWREA	KECIFIEPEK	GRESKGVYWY	.NKF		
L26296	LGDIYQFDGT	PWYVAMYREA	KECIYVEPDR	EGDKKGVYWY	NNKL		
X91139	LGDIYQFDGT	PWVKAMWREA	KECIYVEPDR	QGEKKGVFWY	NNKL		
L43921	LGEYRFDGT	PFVKAMWREA	RECIYVEPDQ	STESKGVFWY	NNKL		
X92847	LGDIYQFDGT	PIYKEMWREA	KECLYVEKDE	SSQKGVFWY	NNKL		
L43920	LGEYQFDDT	PFYKALWREA	RECLYVEPDE	GTSEKGVYWY	RNKY		
U22378	MGEYRYDGT	PFYKALWREA	KECLFVEPDE	GAPTQGVFWY	RNKY		

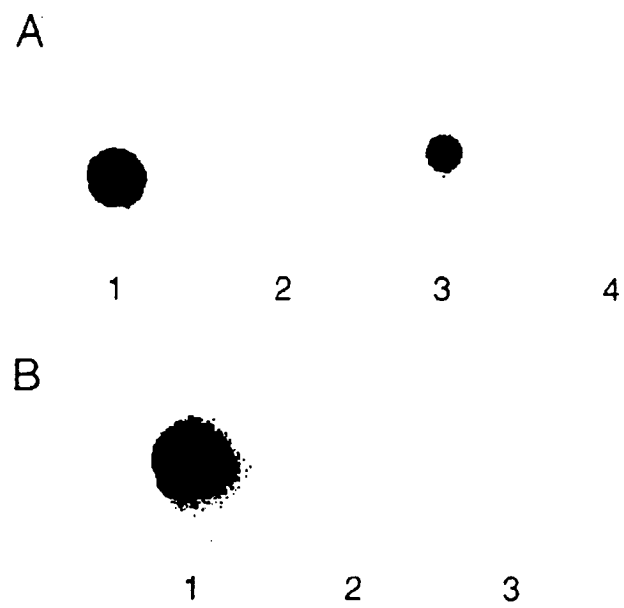
FIGUR 2H



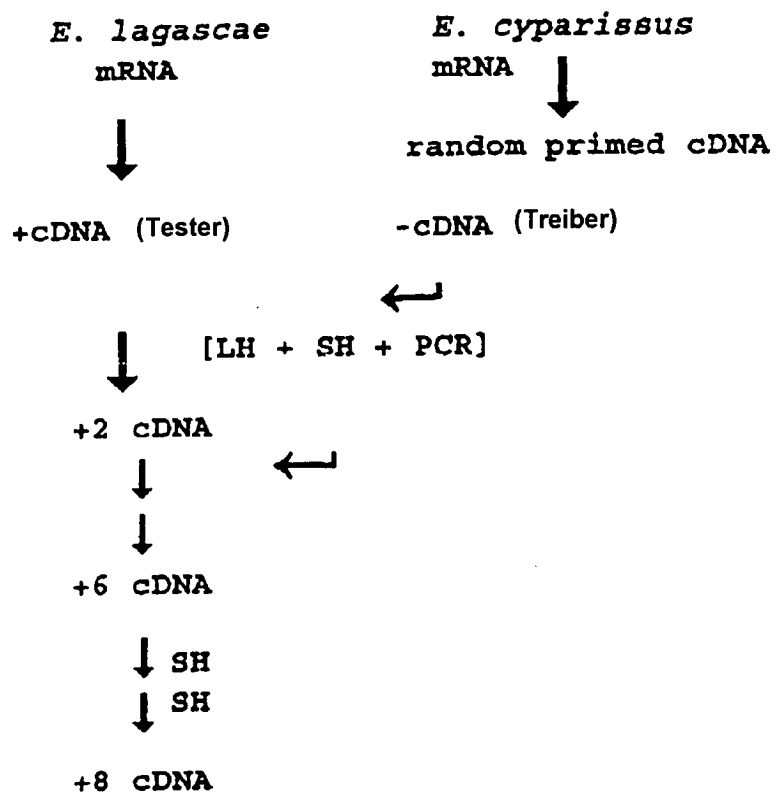
**FIGUR 3**

T-G-G-A-A-T-T-C-C-C-T-C-C-C-T-C-C-C-I-I-I-T-T-C-G-G-A-A-T-G-G-G  
 A C C C  
 T C G T  
 T C G T  
 A G T  
 T A G  
 T

FIGUR 4

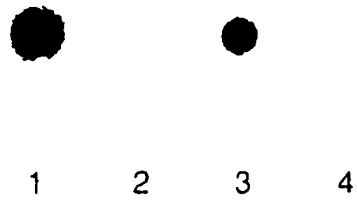


**FIGUR 5**

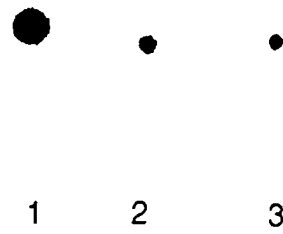


FIGUR 6

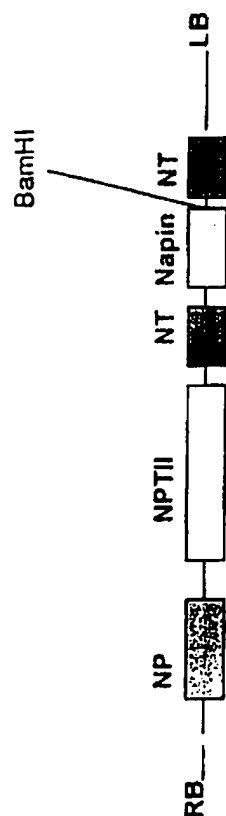
A



B



**FIGUR 7**

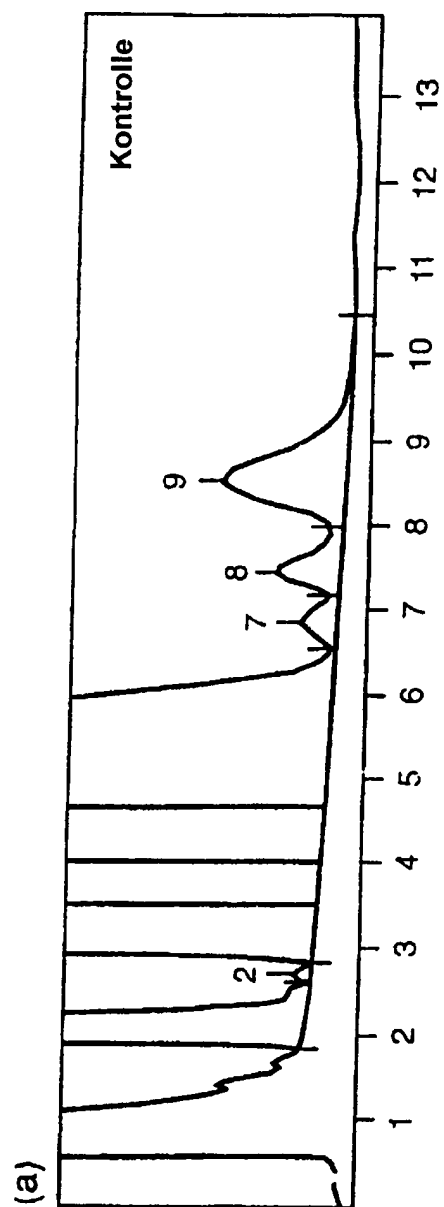


**FIGUR 8**

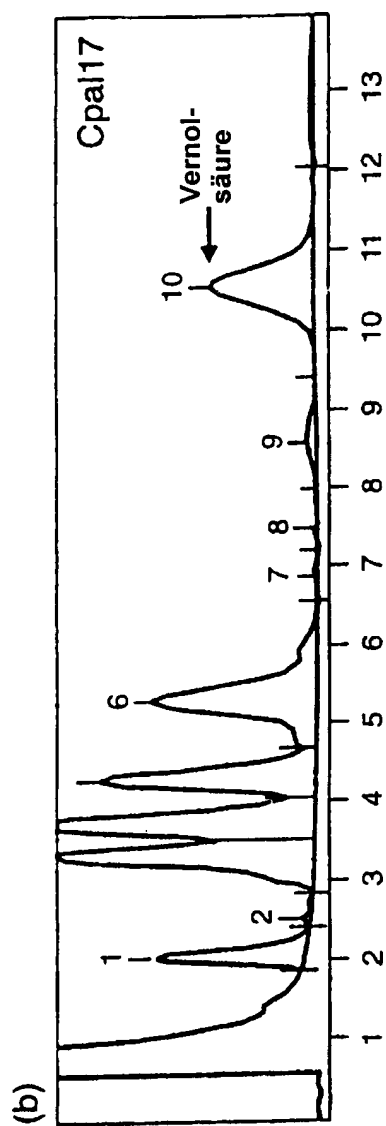


**FIGUR 9**

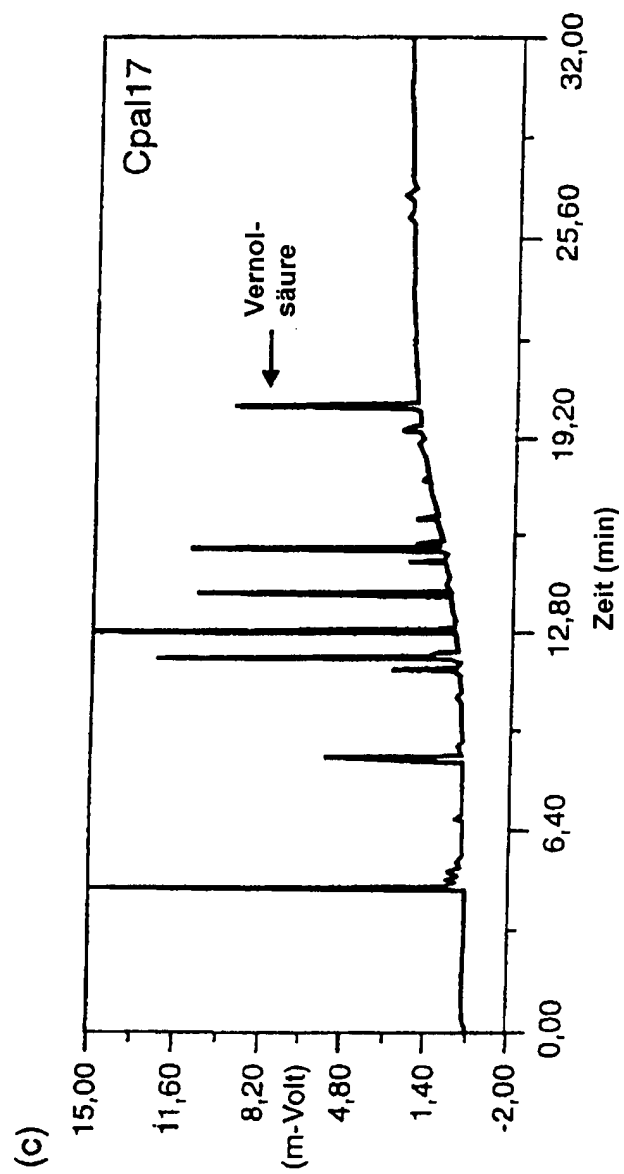




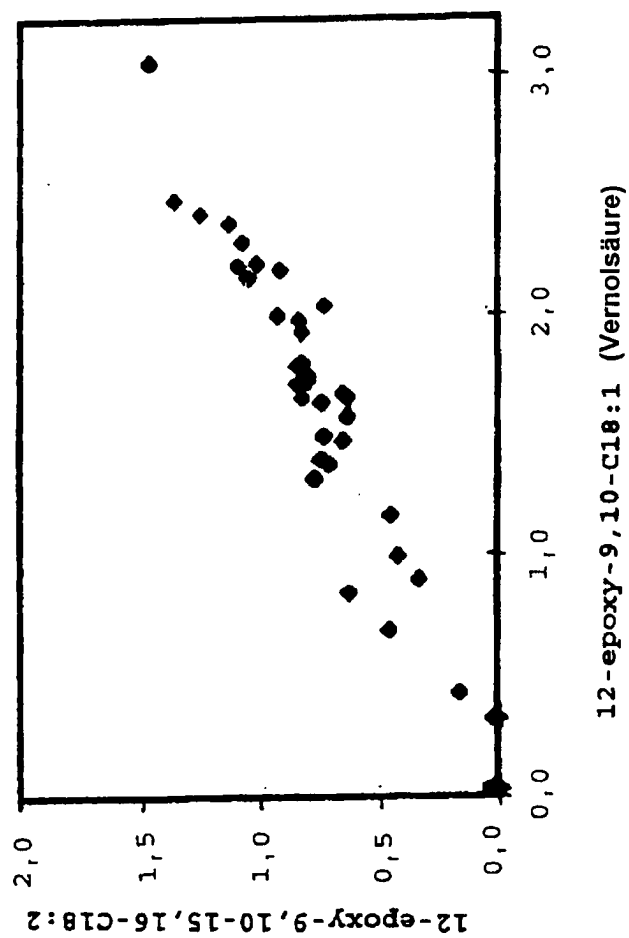
FIGUR 10A



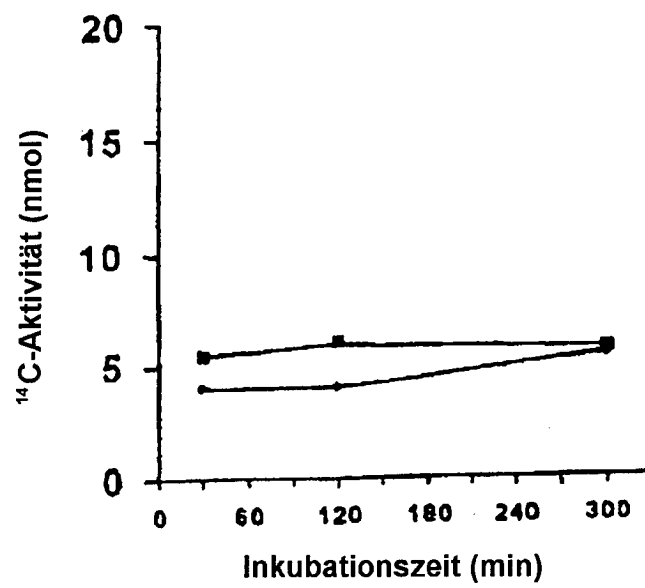
FIGUR 10B



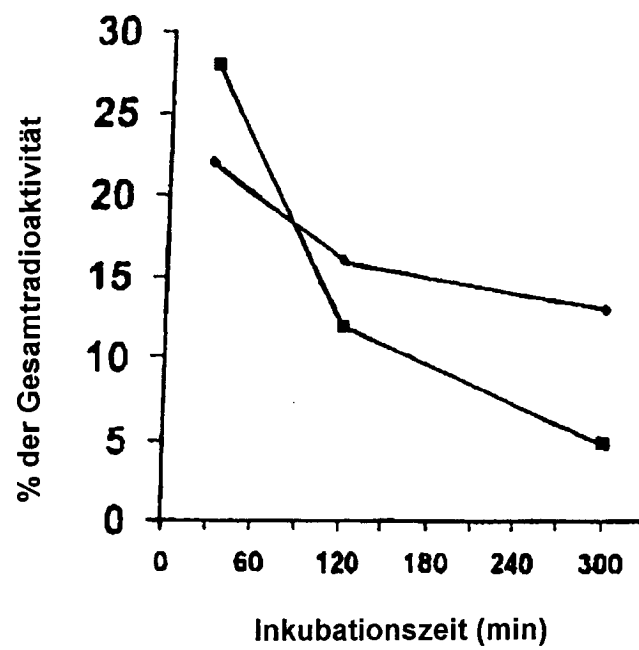
FIGUR 10C



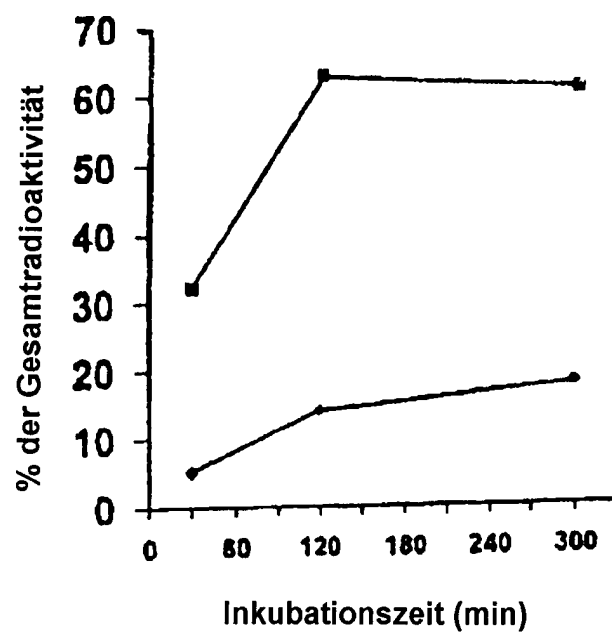
FIGUR 11



**FIGUR 12**



**FIGUR 13**



**FIGUR 14**