

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Januar 2004 (15.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/005442 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C11C 3/14,
C12N 9/90, 15/61, 15/82, C12P 7/64, A01H 5/00

Quedlinburg (DE). **PORZEL, Andrea** [DE/DE]; Streiber-
str. 36, 06110 Halle/S. (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/006833

(74) **Anwalt: PREBLER, Uwe**; c/o BASF Aktiengesellschaft,
., 67056 Ludwigshafen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Juni 2003 (27.06.2003)

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

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 29 978.1 3. Juli 2002 (03.07.2002) DE
103 08 850.4 27. Februar 2003 (27.02.2003) DE

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

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

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): RENZ, Andreas**
[DE/DE]; Heinrich-von-Kleist-Str.6, 67117 Limburgerhof
(DE). **GIPMANS, Martijn** [NL/DE]; Grossbeerstr.
5, 14482 Potsdam (DE). **FEUBNER, Ivo** [DE/DE];
Calsowstr. 12, 37085 Göttingen (DE). **KRÜGER,
Claudia** [DE/DE]; Marktplatz 11, 19294 Eldena (DE).
HORNUNG, Ellen [DE/DE]; Severinweg 3, 06484

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** METHOD FOR THE PRODUCTION OF CONJUGATED POLYUNSATURATED FATTY ACIDS COMPRISING AT LEAST TWO DOUBLE BONDS IN PLANTS

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON KONJUGIERTEN MEHRFACH UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN MIT MINDESTENS ZWEI DOPPELBINDUNGEN IN PFLANZEN

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for producing conjugated polyunsaturated fatty acids comprising at least two, preferably three, double bonds in eukaryotes, especially plants, and a method for producing oils and/or triglycerides having an increased content of conjugated and/or unconjugated polyunsaturated fatty acids comprising at least two, preferably three, double bonds. The invention also relates to a method for producing conjugated linoleic acid in eukaryotes, especially plants, and a method for producing oils and/or triglycerides having an increased content of conjugated linoleic acid. Further disclosed are nucleic acid sequences, nucleic acid constructs, vectors, and organisms containing said nucleic acid sequences, nucleic acid constructs, and/or vectors. The invention finally relates to fatty acid mixtures and triglycerides having an increased content of conjugated and/or unconjugated polyunsaturated fatty acids comprising at least two, preferably three, double bonds, especially conjugated linoleic acid, and the use thereof.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen in Eukaryonten speziell in Pflanzen sowie ein Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an konjugierten und/oder unkonjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure in Eukaryonten speziell in Pflanzen sowie ein Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an konjugierter Linolsäure. Die Erfindung betrifft weiterhin Nucleinsäuresequenzen; Nucleinsäurekonstrukte, Vektoren und Organismen enthaltend die Nucleinsäuresequenzen, Nucleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren. Außerdem betrifft die Erfindung Fettsäuregemische sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an konjugierten und/oder unkonjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen speziell an konjugierter Linolsäure und deren Verwendung.

WO 2004/005442 A1



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

VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON KONJUGIERTEN MEHRFACH UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN MIT MINDESTENS ZWEI DOPPELBINDUNGEN IN PFLANZEN

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen in Eukaryonten speziell in Pflanzen sowie ein Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an konjugierten und/oder unkonjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen.

Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure in Eukaryonten speziell in Pflanzen sowie ein Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an konjugierter Linolsäure.

Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäuresequenzen; Nukleinsäurekonstrukte, Vektoren und Organismen enthaltend die Nukleinsäuresequenzen, Nukleinsäurekonstrukte und/oder Vektoren. Außerdem betrifft die Erfindung Fettsäuregemische sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an konjugierten und/oder unkonjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen speziell an konjugierter Linolsäure und deren Verwendung.

Fettsäuren und Triglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem ob es sich um freie Fettsäuren oder um Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet, so werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie *Mortierella* oder *Schizochytrium* oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Sonnenblume und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form ihrer Triacylglyceride anfallen. Sie werden aber auch vorteilhaft aus Tieren wie Fischen gewonnen. Die freien Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung hergestellt.

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

Besonders wertvolle und gesuchte ungesättigte Fettsäuren sind die sogenannten konjugierten ungesättigten Fettsäuren. Konjugierte mehrfach ungesättigte Fettsäuren kommen im Vergleich zu anderen mehrfach ungesättigte Fettsäuren in der Natur eher selten vor. In Pflanzen kommen diese konjugierten Fettsäuren nur in einzelnen Arten

2

vor wie beispielsweise in den Euphorbiaceae wie *Aleurites fordii* oder in *Calendula officinalis*. Für die konjugierte Linolsäure (= conjugated linoleic acid = CLA) gibt es keine natürliche pflanzliche Quelle.

Die chemische Herstellung konjugierter Fettsäuren beispielsweise Punicinsäure oder konjugierter Linolsäure wird in US 3,356,699 und US 4,164,505 beschrieben. CLA oder andere konjugierte Fettsäuren können chemisch leicht über eine alkalische Isomerisation aus Linolsäure oder Linolensäure oder Ölen, die Linolsäure oder Linolensäure enthalten gewonnen werden. Zwei Reaktionen werden durch die alkalische Isomerisierung bei Temperaturen von beispielsweise bei 180°C katalysiert, zum einen die Hydrolyse der Fettsäureesterbindung in den Triglyceriden und zum anderen die Isomerisierung der Doppelbindungen (WO 99/32604). In diesem Verfahren werden je nach verwendetem Öl ca. 20 bis 35 % cis-9, trans-11 CLA und in etwa gleichen Mengen trans-10, cis-12 CLA hergestellt. Neben diesen Hauptisomeren entstehen weitere Isomere. Eine weitere Anreicherung der verschiedenen Isomere ist über eine aufwendige, teure Reinigung beispielsweise über eine fraktionierte Kristallisation möglich. Auf diesem Wege lassen sich jedoch keine reinen Isomere der CLA gewinnen.

Die Herstellung von konjugierter Linolsäure durch die enzymatische Aktivität einer Desaturase wird von Qiu et al., (*Plant Physiology*, 125, 2001, 847-855) beschrieben. Von Nachteil ist bei dieser Aktivität jedoch, dass durch die enzymatische Wirkung das unerwünschte 8,10-Isomer der konjugierten Linolsäure entsteht.

Weiterhin wurden eine Reihe von prokaryontischen Mikroorganismen beschrieben, die in Starterkulturen oder im Pansen von Wiederkäuern vorkommen und die natürlicherweise CLA produzieren. Vermutlich ist CLA dabei ein Abbauprodukt der Linolsäure auf dem Weg zur Stearidonsäure. In WO 99/29886 werden Bakterien zur Anreicherung von CLA in Lebens- und Futtermittel offenbart.

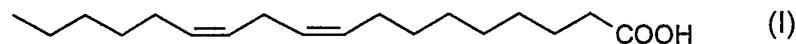
In WO 99/32604 wird eine Linoleat-Isomerase aus *Lactobacillus reuteri* beschrieben. Die Enzymaktivität führt zur Umsetzung von Linolsäure in sechs verschiedene Isomere der CLA [(cis,trans)-9,11-CLA, (trans,cis)-10,12-CLA, (cis,cis)-9,11-CLA, (cis,cis)-10,12-CLA, (trans,trans)-9,11-CLA and (trans,trans)-10,12-CLA]. Von Nachteil bei dieser Isomerase ist, dass die Ausbeute in der Reaktion gering ist und die Reinheit der CLA zu wünschen lässt. Dies führt zu einem wirtschaftlich wenig attraktiven Prozess.

Von Kepler et al. wurde eine Isomerase aus *Butyrivibrio fibrisolvens* (Kepler and Tovee, *J. Biol. Chem.*, 1966, 241: 1350) und von Deng et al. wurde eine aus *Propionibacterium acnes* (Deng et al., 1st International Conference on CLA, 2001, Alesund, Norway) beschrieben. In WO 99/29886 wird eine Isomerase aus *Bifidobacterium* offenbart und beansprucht. Die bisher beschriebenen CLA Isomerasen verwenden freie Fettsäuren als Substrat. Das Gen codierend für CLA Isomerase aus *Lactobacillus reuteri* und *Propionibacterium acnes* wurde kloniert und konnte in prokaryontischen Mikroorganismen funktional exprimiert werden. Eine Expression in Eukaryonten gelang bisher nicht. Die biologische Umsetzung von Linolsäure zu CLA durch Mikroorganismen hat zwar qualitative Vorteile gegenüber der chemischen Umsetzung, sie ist aber aufgrund

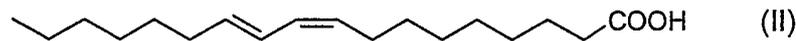
der Fermentationskosten ökonomisch nachteilig und liefert lediglich freie Fettsäuren, aber keine Triglyceride.

Konjugierte Linolsäure ist ein Zwischenprodukt des Linolsäurestoffwechsels in Wiederkäuern. CLA ist ein Sammelbegriff für positionelle und strukturelle Isomere der Linolsäure, die sich durch ein konjugiertes Doppelbindungssystem am Kohlenstoffatom 8, 9, 10, 11, 12 oder 13 auszeichnen. Geometrische Isomere existieren für jedes dieser positionellen Isomere, also cis-cis, trans-cis, cis-trans, trans-trans. Vor allem C18:2 cis-9, trans-11 und C18:2 trans-10, cis-12 CLAs, die die biologisch aktivsten Isomere darstellen, sind von besonderem Interesse, da sie sich im Tierexperiment als krebsvorbeugend erwiesen haben, anti-arteriosklerotisch wirken und in Mensch und Tier den Körperfettanteil reduzieren. Kommerziell werden CLAs heute hauptsächlich als freie Fettsäure vertrieben.

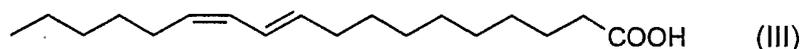
Für den Menschen sind die wichtigsten natürlichen Quellen für CLA vor allem tierische Fette. Wie oben erwähnt gibt es keine pflanzlichen Quellen. So besitzen Fette von wiederkäuenden Tieren, wie Rindern (Chin, Journal of Food Composition and Analysis, 5, 1992: 185 – 197) und Schafen, sowie Molkereiprodukte sehr hohe CLA-Konzentrationen. Bei Rindern findet man 2,9 bis 8,9 mg/g Fett. Dagegen besitzen Pflanzenöle, Margarinen und Fette von nicht-wiederkäuenden Tieren CLA-Konzentrationen von nur 0,6 bis 0,9 mg/g Fett.



Linolsäure (18:2, c9, c12)



CLA (C18:2, c9, t11)



CLA (C18:2, t10, c12)

Für CLA sind eine Reihe positiver Effekte nachgewiesen worden. So reduziert die Verabreichung von konjugierter Linolsäure das Körperfett in Mensch und Tier bzw. erhöht den Futterumsatz pro Körpergewicht bei Tieren (WO 94/16690, WO 96/06605, WO 97/46230, WO 97/46118). Durch Gabe von konjugierter Linolsäure lassen sich auch beispielsweise Allergien (WO 97/32008), Diabetes (WO 99/29317) oder Krebs positiv (Banni, Carcinogenesis, Vol. 20, 1999: 1019-1024, Thompson, Cancer, Res., Vol. 57, 1997: 5067-5072) beeinflussen. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren werden auch Baby-

nahrung zur "Erhöhung des Nährwertes" und als essentielle Bausteine, die Wachstum und Gehirnentwicklung gewährleisten, zugesetzt.

Nur wenige Daten sind über die tägliche CLA-Aufnahme des Menschen erhältlich. In Deutschland beträgt die tägliche CLA-Aufnahme ungefähr 0,36 g/Tag für Frauen und
5 0,44 g/Tag für Männer [Fritsche et al., Zeitschrift Lebensmittel. Untersuchung Forschung A-Food Research & Technology 205:415-418 (1997)].

CLA hat wie oben beschrieben sehr weitreichende positive ernährungsphysiologische Wirkungen. CLA kommt jedoch natürlicherweise in signifikanten Mengen nur bei Wiederkäuern und deren Produkten, wie Milch, Käse etc. vor. Es besteht daher ein großer
10 Bedarf an Alternativen des aus diesen tierischen Quellen stammenden CLA, insbesondere um eine ausgeglichene und gesunde Ernährung in weniger entwickelten Regionen zu gewährleisten, in denen die Versorgung mit diesen tierischen Fetten unzureichend oder eine synthetische Herstellung zu teuer ist. Aber auch in entwickelten Regionen hat der Verzehr an Fleisch- und Milchprodukten abgenommen, um den Anteil an
15 als ungesund geltenden gesättigten Fettsäuren zu verringern. Dies bedeutet aber gleichzeitig auch eine Verringerung der Aufnahme an "gesunder" CLA.

Im Gegensatz zu CLA kommen konjugierte Polyensäuren nicht in signifikanten Mengen in tierischen Lipiden vor, während sie in einigen pflanzlichen Ölen hauptsächlich als
20 C₁₈-triene oder Tetraene vorkommen. Beispiele für derartige konjugierte Octadecatensäuren sind die Eleostearinsäure (= Eleostearic acid, 9c,11t,13t) aus *Aleurites fordii* (Euphorbiaceae) oder *Prunus mahaleb* (= Felsenkirsche), die Punicasäure (9c,11t,13c) aus *Punica granatum*, die Calendulasäure (8t,10t,12c) aus *Calendula officinalis* (= Ringelblume), die Parinarsäure (9c,11t,13t,15c) aus *Parinarium* sp. (Rosaceae) oder *Impatiens balsamina*. Auch aus marinen Algen wie der Grünalge *Anadyomena stellata* lassen sich konjugierte Octadecatensäuren isolieren. Diese konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren haben ein großes Anwendungspotential in Nahrungsmitteln, Kosmetika und/oder Pharmazeutika. Zur Anwendung kommt beispielsweise heute schon Calendulasäure als Bestandteil in vielen Kosmetika.

Um eine Anreicherung der Nahrung und des Futters mit diesen konjugierten Polyensäuren speziell CLA zu ermöglichen, besteht daher ein großer Bedarf an einem einfachen, kostengünstigen Verfahren zur Herstellung dieser konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren bzw. zur Herstellung von konjugierter Linolsäure.

Es bestand daher die Aufgabe ein entsprechendes Verfahren zur Verfügung zu stellen. Diese Aufgabe wurde durch die im folgenden beschriebenen Verfahren speziell durch
35 ein Verfahren zur Herstellung von konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in transgenen eukaryontischen Organismen gelöst, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:

- a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 in einen ungesättigte Fettsäuren produzierenden Organismus; oder
40

- b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz, die sich durch Rückübersetzung in eine Nukleinsäuresequenz von der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenz aufgrund des degenerierten genetischen Codes ableitet, oder
- 5 c) Einbringen mindestens eines Derivates der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 90 % Identität auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich verändert ist, und
- 10 d) Expression der Nukleinsäure im nach (a), (b) oder (c) hergestellten Organismus, und
- e) Anzucht und Ernte des nach (a), (b) oder (c) hergestellten Organismus.

Vorteilhaft enthalten die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens drei Doppelbindungen. Besonders vorteilhaft enthalten die Fettsäuren zwei oder drei Doppelbindungen. Neben den konjugierten Doppelbindungen können noch weitere nicht-konjugierte Doppelbindungen im Fettsäuremolekül enthalten sein. Es können vorteilhaft zwei (= Diene) oder drei (= Triene) Doppelbindungen in Konjugation sein. Die hergestellten Fettsäuren können bis zu 6 Doppelbindungen im Molekül enthalten. Im Verfahren hergestellte bzw. umgesetzte Fettsäuren haben vorteilhaft 18 bis 22 C-Atome in der Fettsäurekette. Tabelle 1 gibt die Substrate sowie der Umsetzungsprodukte wieder. Vorteilhaft werden C18-Fettsäuren umgesetzt. Ein bevorzugtes Reaktionsprodukt ist die Trien-Fettsäure 18:3(11E,13E,15Z), die durch Umsetzung der Fettsäure 18:3(9Z,12Z,15Z) entstanden ist. Die Konfiguration der Doppelbindungen wurde, wenn nicht anders beschrieben über NMR-Analyse bestimmt. Die Fettsäuren enthalten nach Umsetzung im erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft zwei (= Dien) oder drei (= Trien) Doppelbindungen in Konjugation. Diese können im Reaktionsgemisch als einziges Produkt enthalten sein oder aber in einer Mischung aus konjugierten Doppelbindungen, das heißt im Reaktionsgemisch sind gleichzeitig konjugierte dreifach und zweifach Doppelbindungen enthalten. Daneben können weitere Doppelbindungen im Fettsäuremolekül enthalten sein, die nicht in Konjugation zu den anderen Doppelbindungen sind. Es können vorteilhaft zwei oder drei Doppelbindungen in Konjugation liegen.

Eine vorteilhafte Ausführungsform des vorgenannten Verfahrens ist ein Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure in transgenen eukaryontischen Organismen gelöst, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:

- 35 a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 in einen ungesättigte Fettsäuren vorteilhaft Linolsäure produzierenden Organismus; oder

6

- b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz, die sich durch Rückübersetzung in eine Nukleinsäuresequenz von der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenz aufgrund des degenerierten genetischen Codes ableitet, oder
- 5 c) Einbringen mindestens eines Derivates der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 90 % Identität auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich verändert ist, oder
- 10 d) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz, die sich von dem prokaryontischen codon-usage der Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 11 durch mindestens 0,5 %, vorteilhaft mindestens 1, 2, 3 oder 5 % bevorzugt mindestens 6, 7, 8, 9 oder 10 %, besonders bevorzugt mindestens 20, 30, 40 oder 50 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 60, 70, 80 oder 90 % eines eukaryontischen codon-usage unterscheidet, oder
- 15 e) Einbringen eines Derivate der unter (d) beanspruchten Nukleinsäuresequenzen, die um mindestens ein, vorteilhaft mindestens 2, bevorzugt mindestens 3, besonders bevorzugt mindestens 4, ganz besonders bevorzugt mindestens 5 - Codontripletts vorteilhaft am 5' Ende der Nukleinsäuresequenzen, die für eine Aminosäure codieren, verlängert ist, ohne dass die enzymatische Wirkung der durch die Nukleinsäuren codierten Polypeptide wesentlich verändert ist, und
- 20 f) Expression der Nukleinsäure im nach (a), (b), (c), (d) oder (e) hergestellten Organismus, und ggf.
- 25 g) ggf. Anzucht und Ernte des nach (a), (b), (c), (d) oder (e) hergestellten Organismus.

Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren die vorgenannten Nukleinsäuren verwendet, nachdem ihr sogenannter codon-usage zur Expression in Eukaryonten bevorzugt zur Expression in Hefen verändert wurde. Entsprechende Modifikationen wurden vorgenommen und sind den Beispielen zu entnehmen.

30

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Ölen oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen speziell mit einem erhöhten Gehalt an konjugierter Linolsäure (= CLA) dadurch gekennzeichnet, dass die im Organismus enthaltenen Öle bzw. die im Organismus enthaltenen Triglyceride aus dem Organismus isoliert werden. Dies kann nach üblichen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen, die speziell in der Fettchemie Anwendung finden. Beispielsweise lassen sich die Öle und Triglyceride durch Ernten der transgenen Organismen entweder aus der Kultur, in der sie wachsen, oder vom Feld gewinnen. Die weitere Aufarbei-

35

tung kann beispielsweise im Falle von Pflanzen durch Pressen oder Extraktion der Pflanzenteile bevorzugt der Pflanzensamen erfolgen. Dabei können die Öle, Fette, Lipide und/oder freien Fettsäuren durch sogenanntes kalt schlagen oder kalt pressen ohne Zuführung von Wärme durch Pressen gewonnen werden. Damit sich die Pflanzenteile speziell die Samen leichter aufschließen lassen, werden sie vorher zerkleinert, gedämpft oder geröstet. Die so vorbehandelten Samen können anschließend gepresst werden oder mit Lösungsmittel wie kaltem oder vorteilhaft warmen Hexan oder Cyclohexan extrahiert werden. Anschließend wird das Lösungsmittel wieder entfernt. Auf diese Weise können mehr als 96 % der im Verfahren hergestellten Verbindungen isoliert werden. Anschließend werden die so erhaltenen Produkte weiter bearbeitet, das heißt raffiniert. Dabei werden zunächst die Pflanzenschleime und Trübstoffe. Die sogenannte Entschleimung kann enzymatisch oder beispielsweise chemisch/physikalisch durch Zugabe von Säure wie Phosphorsäure erfolgen. Anschließend werden die freien Fettsäuren durch Behandlung mit einer Base beispielsweise Natron- und/oder Kalilauge entfernt. Das erhaltene Produkt wird zur Entfernung der im Produkt verbliebenen Lauge mit Wasser gründlich gewaschen und getrocknet. Um die noch im Produkt enthaltenen Farbstoffe zu entfernen werden die Produkte einer Bleichung mit beispielsweise Bleicherde oder Aktivkohle unterzogen. Zum Schluss wird das Produkt noch beispielsweise mit Wasserdampf desodoriert.

Die im Öl oder in den Glyceriden enthaltenden Fettsäuren können nach dem Isolieren anschließend nach dem Fachmann bekannten Methoden durch saure oder alkalische Hydrolyse freigesetzt werden.

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

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

Eine erfindungsgemäße Ausführungsform sind deshalb Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, besonders bevorzugt sind Öle, Lipide oder Fettsäurezusammensetzungen, die einen erhöhten Gehalt an konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen speziell an konjugierter Linolsäure umfassen und von transgenen Pflanzen herrühren. Die Lipide bestehen vorteilhaft im wesentlichen aus Glyceriden, wobei diese wiederum im wesentlichen aus Triglyceriden bestehen. Unter erhöhtem Gehalt an konjugierten und/oder nicht konjugierten

mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen ist ein Gehalt an konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen in den Ölen, Lipiden oder Fettsäurezusammensetzungen (= Fettsäuregemische) zu verstehen, der mindestens 10 %, vorteilhaft mindestens 20 %, bevorzugt mindestens 30 %, besonders bevorzugt von mindestens 40 % und ganz besonders bevorzugt von mindestens 50 % über dem Gehalt des eukaryontischen Ausgangsorganismus liegt, der die im erfinderischen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren nicht enthält. Im Falle von transgenen Pflanzen bedeutet ein erhöhter Gehalt an konjugierten und/oder nicht konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen vorteilhaft ein Gehalt an konjugierten und/oder nicht konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen wie Calendulasäure, Punicasäure, Eleostearinsäure oder CLA in den Ölen, Lipiden oder Fettsäurezusammensetzungen (= Fettsäuregemische), der mindestens 100 %, vorteilhaft mindestens 200 %, bevorzugt mindestens 250 %, besonders bevorzugt von mindestens 300 % und ganz besonders bevorzugt von mindestens 500 % über dem Gehalt der Ausgangspflanze liegt, die die im erfinderischen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren nicht enthält. Die vorgeannten % Angaben beziehen sich auf die Gesamtmenge des Öls, der Lipide oder Fettsäuregemische in den Ausgangsorganismen nicht auf weitere Bestandteile in den Organismen.

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich damit konjugierte mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen speziell CLA in eukaryontischen Organismen wie Hefen, Pilzen oder vorteilhaft Pflanzen herstellen. Auch eine Herstellung in nicht-humanen Tieren ist prinzipiell möglich. Neben diesen in den Verfahren hergestellten konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren können noch weitere ungesättigte oder gesättigte Fettsäuren in den Ölen, Lipiden oder Fettsäuregemischen enthalten sein.

Vorteilhaft werden im Verfahren Gehalte an den vorgeannten konjugierte mehrfach ungesättigten Fettsäuren bzw. an CLA in den Organismen von mindestens 1 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 3 Gew.-%, bevorzugt mindestens von 5 Gew.-%, besonders bevorzugt von mindestens 10 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt von mindestens 20 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtfettsäuren des Organismus, erreicht. Die vorgeannten Gew.-% Angaben beziehen sich auf die Gesamtmenge des Öls, der Lipide oder Fettsäuregemische nicht auf weitere Bestandteile.

In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausgestaltung des Verfahrens zur Herstellung von konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen mit oder in transgenen eukaryontischen Organismen ist das Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:

- a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 in einen ungesättigte Fettsäuren produzierenden Organismus; oder

- b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz, die sich von dem prokaryontischen codon-usage der Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 11 durch mindestens 0,5 % eines eukaryontischen codon-usage unterscheidet, oder
- 5 c) Einbringen mindestens eines Derivate der unter (b) beanspruchten Nukleinsäuresequenzen, die um mindestens ein Codontriplett der Nukleinsäuresequenzen, die für eine Aminosäure codieren, verlängert ist, ohne dass die enzymatische Wirkung der durch die Nukleinsäuren codierten Polypeptide wesentlich verändert ist.
- 10 d) Expression der Nukleinsäure im nach (a), (b) oder (c) hergestellten Organismus.
- Vorteilhaft handelt es sich bei der im vorgenannten Verfahren hergestellten konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen um konjugierte Linolsäure.
- Eine weitere erfindungsgemäßen Ausgestaltung betrifft ein Verfahrens zur Herstellung
- 15 von konjugierter Linolsäure mit oder in transgenen eukaryontischen Organismen, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:
- a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 in einen Linolsäure produzierenden Organismus; oder
- 20 b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz, die sich von dem prokaryontischen codon-usage der Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 11 durch mindestens 0,5 % eines eukaryontischen codon-usage unterscheidet, oder
- 25 c) Einbringen mindestens eines Derivate der unter (b) beanspruchten Nukleinsäuresequenzen, die um mindestens ein Codontriplett der Nukleinsäuresequenzen, die für eine Aminosäure codieren, verlängert ist, ohne dass die enzymatische Wirkung der durch die Nukleinsäuren codierten Polypeptide wesentlich verändert ist,
- d) Expression der Nukleinsäure im nach (a), (b) oder (c) hergestellten Organismus.
- 30 Vorteilhaft weisen die jeweils in den zwei vorgenannten Verfahren unter dem Punkt (b) genannten Nukleinsäuresequenzen eine möglichst geringe Abänderung des codon-usage auf, da diese wenigen Änderungen schon den erfinderischen Effekt aufweisen, das heißt die Expression der Nukleinsäuresequenzen in den eukaryontischen Organismen ermöglichen und da je weniger Änderungen des codon-usage in die Sequenzen eingefügt werden müssen, desto einfacher lassen sich diese Sequenzen in vitro
- 35 erzeugen. Vorteilhaft sollten die Änderungen in einem Bereich von 0,5 bis 99 %, vorteilhaft zwischen 0,5 bis 90 %, bevorzugt zwischen 1 bis 50 %, besonders bevorzugt

zwischen 1 bis 40 %, ganz besonders bevorzugt zwischen 1 bis 20 % der gesamten Sequenz liegen. Bevorzugt werden diese Änderungen am aminoterminalen Ende bzw. 5'-Ende der Sequenzen eingefügt. Es ist aber auch eine Änderung an anderer Stelle möglich, beispielsweise am C-Terminus oder innerhalb der Sequenz oder an mehreren Stellen innerhalb der Sequenz.

Der mRNA-instruierte Vorgang der Translation in ein Protein wird durch den codon-usage eines jeden speziellen Organismus beeinflusst. Wobei die Funktion $f(x) \rightarrow y$, mit x aus der Menge der Codonen, des genetischen Codes, y aus der Menge der Aminosäuren notiert werden, hierbei ist f eine Funktion, die jedes Codon genau auf eine Aminosäure abbildet. Diese Abbildung erfolgt im Sinne der Mathematik nicht eineindeutig, das heißt mehrere Codonen codieren für dieselbe Aminosäure. Der genetische Code wird deshalb als degeneriert bezeichnet, da einige Aminosäuren durch mehrere (synonyme) Codonen codiert werden. Nicht für jedes Codon existiert eine spezifische tRNA, an Position eins des Anticodons können modifizierte Basen eingebaut sein und im Codon/Anticodon-Komplex sind an der dritten Position des Codons Fehlpaarungen erlaubt (Cricksche Wobble-Regel). Die Informationsgehalt der drei Basenpositionen im Codon ist nicht gleich, es gilt der höchste Informationsgehalt ist in Position 2, danach folgt Position 1 gefolgt von Position 3. Deshalb verändert eine Mutation der dritten Base im Codon die Aminosäurenkomposition häufig nicht, eine Mutation in der ersten Basenposition führt häufig zum Einbau einer Aminosäure mit ähnlichen Eigenschaften, eine Mutation der mittleren Base verursacht häufig den Einbau einer Aminosäure mit anderen Eigenschaften. Die geringsten Auswirkungen auf die Aminosäurenkomposition der Proteine haben somit Veränderungen der Basenkomposition in Position drei des Codons, gefolgt von Veränderungen der Basenkomposition an Position eins. Trotzdem ist der genetische Code quasi universell, abweichende Codonzuordnungen finden sich jedoch z.B. bei Mitochondrien, Mycoplasma und einigen Protozoen. Die Häufigkeit, mit der Codonen in Genen vorkommen, schwankt zwischen den taxonomischen Gruppen beträchtlich. Die Codonpräferenzen von *E. coli* und *Salmonella typhimurium* sind sich relativ ähnlich, die der von ihnen taxonomisch entfernte Gattung *Bacillus* speziell die Spezies *B. subtilis* weichen von beiden stark ab. Innerhalb des genetischen Codes gibt es synonyme Codonen, die für dieselbe Aminosäure codieren. Die Verwendung dieser synonymen Codonen in den verschiedenen Organismen erfolgt nicht mit vergleichbarer Häufigkeit, das heißt einige werden bevorzugt eingebaut. Zusätzlich variiert die Codon-Häufigkeiten noch innerhalb einer Species zwischen verschiedenen Genen, je nachdem wie stark diese Gene exprimiert werden sollen. In bestimmten Genen tritt spezies-spezifisch eine Teilmenge der Codonen bevorzugt auf. Diese Verzerrung der Codon-Häufigkeiten ist, wie gesagt, positiv korreliert mit der Genexpression. Mögliche Ursachen für diese Verzerrung der Codon-Häufigkeiten sind die unterschiedlichen Konzentrationen der tRNAs, die Aufrechterhaltung der maximalen Elongationsrate, die Kosten für das Korrekturlesen sowie unterschiedliche Translationsraten der Codonen etc.. Diese Verzerrung der Codon-Häufigkeiten wird als "Strategie" interpretiert, die Wachstumsraten zu optimieren. Da in den verschiedenen Organismen ein unterschiedlicher Codongebrauch für dieselbe Aminosäure verwendet wird, das heißt die Codonen anders abgebildet werden, gibt es bei der Expression einer definierten aus einem Orga-

nismus stammenden Sequenz in einem anderen Organismus immer wieder unvorhersehbare Überraschungen, das heißt eine Sequenz kann plötzlich deutlich stärker oder schwächer oder gar nicht mehr exprimiert werden. Häufig erfolgt auch trotz Anpassung des genetischen Codes der Sequenzen auf den Wirtsorganismus keine Expression der Sequenzen. Um so unerwarteter war es, dass die erfindungsgemäßen Sequenzen schon nach einer Änderung von ca. 0,5 % der Codonen exprimiert wurden. Da der genetische Code dem Fachmann geläufig ist ebenso wie der Codongebrauch unterschiedlicher Gattungen und Arten und da für die Codonanpassung Algorithmen zur Verfügung stehen, kann er eine Anpassung der erfindungsgemäßen Sequenz an das condon-usage des Wirtsorganismus vornehmen. Beispiele für eine derartige Übersetzung sind den verwendeten Primern I und II zu entnehmen.

Vorteilhaft wird zur Verbesserung der Expression der im Verfahren verwendeten vorteilhaften Nukleinsäuren SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 und SEQ ID NO: 11 in einem transgenen (Wirts)organismus die Sequenz in der Weise verändert, dass der codon-usage nach dem Startkodon so verändert wird, dass er optimal an den codon-usage des zur Expression verwendeten eukaryontischen nicht-humanen Organismus angepasst ist und dadurch optimal exprimiert wird. Diese Veränderung kann vorteilhaft mit Hilfe der folgenden Primer erfolgen, wobei die Primer I vorteilhaft für die Veränderung der Bifidobakteriumsequenz (SEQ ID NO: 9) und die Primer II vorteilhaft für die Veränderung der Lactobacillussequenz (SEQ ID NO: 11) verwendet werden:

Primer I:

BBI-KpnIa: GGT ACC ATG GGT TAC TAC TCC TCC GGT AAC TAC GAA GCT
TTC GCT AGA CCA AAG AAG CCA GCT GGT GTT G (5'Primer)

BBI-XhoIb: CTC GAG CAG ATC ACA TGG TAT TCG CGT AGC AG (3'Primer)

Primer II:

LRI-EcoRIa: GAA TTC ACC ATG GGT TAC TAC TCC AAC GGT AAC TAC GAA
GCT TTC GCT AGA CCA AAG AAG CCA GCT GGT G (5'Primer)

LRI-XhoIb: CTC GAG TTA TAG TAA GTG CTG TTG CTC CAT TAA TTC
(3'Primer)

Der zur Veränderung von SEQ ID NO: 7 (Propionibakteriumsequenz) verwendete Primer ist den Beispielen zu entnehmen. Die korrespondierenden ursprünglichen Aminosäuresequenzen der Sequenzen SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 und SEQ ID NO: 11 sind den Sequenzen SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 und SEQ ID NO: 12 zu entnehmen.

Mit einem entsprechenden Vorgehen lassen sich auch die Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 5 weiter verändern.

Durch diese Veränderung des codon-usage wird eine zusätzliche Aminosäure in die Aminosäuresequenzen eingefügt (siehe SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 6), wobei jedoch die sonstige Aminosäuresequenz erhalten bleibt. Weiterhin wird eine Schnittstelle in die Nukleinsäure(n) für ein Restriktionsenzym eingefügt. Die Veränderung führt zu folgenden geänderten Nukleinsäuresequenzen:

BBI (Bifidobacteriumssequenz):

atgggtactactcctccggttaactacgaagcttcgctagaccaaagaagccagctggtgtg (modifiziert)

atg---tactacagcagcggcaactatgaggcgttgcccgtccgaagaagccagccggcgtag (Original)

10 LRI (Lactobacillussequenz):

atgggtactactccaacggtaactacgaagcttcgctagaccaaagaagccagctggtg (modifiziert)

atg---tattattcaaacgggaattatgaagccttgctcgaccaaagaagcctgctggcg..(Original).

Für eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist es vorteilhaft für eine optimale Expression heterologer Gene in einem Organismus die Nukleinsäuresequenzen entsprechend des im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" vollständig zu verändern. Dies führt vorteilhaft zu einer weiteren Steigerung der Expression. neben der Sequenzveränderung über den vorgenannten Primer.

Die unter Punkt (c) beschriebenen Nukleinsäuresequenzen weisen vorteilhaft nur ein weiteres Codontriplett auf. Dies führt zu einer um eine Aminosäure verlängerte Aminosäuresequenz der Isomerase. Prinzipiell ist auch eine Veränderung der Sequenz ohne eine Verlängerung der Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz möglich. Im vorliegenden Fall wurde durch die Verlängerung das Codon GGT nach dem Startcodon ATG eingeführt. Die sich dadurch bildende Basensequenz ATGG gilt als consensus-Sequenz, die sich vorteilhaft auf die Translation also vorteilhaft auf die Proteinsynthese auswirkt.

Der so hergestellte Organismus kann dann vorteilhaft angezogen und nach Anzucht wie oben beschrieben geerntet werden. Anschließend können die im Organismus enthaltenen Öle, Lipide und/oder Fettsäuregemische isoliert werden und wie beschrieben weiter behandelt werden.

Vor der Anzucht und Ernte oder während der Anzucht kann jedoch vorteilhaft noch Linolsäure und/oder Linolensäure und/oder weitere mehrfach ungesättigte C₁₈-, C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuren gefüttert werden, so dass dadurch der Gehalt an konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen vorteilhaft an CLA im Organismus oder im Anzuchtmedium des Organismus gesteigert werden kann. Anschließend kann der nach (a), (b) oder (c) hergestellte Organismus angezogen und geerntet werden.

Es ist jedoch in einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung auch möglich den nach (a), (b) oder (c) hergestellten Organismus direkt oder nach Anzucht zu ernten und mit diesem entweder nach Aufschluss des Organismus oder ohne Aufschluss eine Umsetzung von Linolsäure und/oder Linolensäure und/oder weitere mehrfach ungesättigte C₁₈-, C₂₀- und/oder C₂₂-Fettsäuren zu konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen vorteilhaft eine Umsetzung von Linolsäure zu CLA in vitro durchzuführen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren bzw. in den erfindungsgemäßen Verfahren (der Singular soll hier den Plural mit umfassen) werden bevorzugt SEQ ID NO: 1 und ihre Derivate verwendet.

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

Die vorliegende Erfindung betrifft in einer weiteren Ausführungsform deshalb ein Verfahren zur Herstellung einer Lebensmittel-, Nahrungsergänzungsmittel-, Tierfuttermittel- oder Arzneimittelzubereitung, umfassend die Zugabe einer konjugierten und/oder nicht-konjugierten trans/cis Octadecadiensäure, Octadecatriensäure, Octadecatetraensäure, Eicosatriensäure, Eicosatetraensäure, Eicosapentaensäure, Docosatriensäure, Docosatetraensäure, Docosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure zur Zubereitung. Vorzugsweise hat die genannte trans/cis Octadecatriensäure eine c9,t11-, t10,c12- oder 11E,13E,15Z- -Konfiguration.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einzelner biologisch aktiver Isomere der vorgenannten Fettsäuren in vorteilhaften Pflanzen. Bevorzugt lassen sich einzelne biologisch aktive CLA Isomere herstellen. Vorteilhaft wird das Isomerase-Gen entweder in unveränderter Form oder in Fusion mit anderen Genfragmenten so exprimiert, dass das Protein entweder im Cytosol, im Chloroplasten bzw. mit Membranen assoziiert vorliegt oder an Oleosomen gebunden ist. Die Expression der verwendeten Isomerasen kann vorteilhaft in allen Teilen der Pflanze wie Wurzel, Stiel, Blatt, Blüte, Knospe oder Samen erfolgen, vorteilhaft im Samen dieser Pflanzen.

Durch die enzymatische Aktivität der heterolog exprimierten im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Isomerasen werden die als Substrat (= Edukt) verwendeten Fettsäuren in die entsprechenden konjugierten Fettsäuren umgesetzt, dabei können zwei oder mehrere der Doppelbindungen in den Fettsäuremolekülen durch die enzymatische Reaktion in Konjugation gebracht werden, vorteilhaft werden zwei oder drei Doppelbindungen zueinander in Konjugation gebracht. Vorteilhaft wird Linolsäure in das c9,t11- oder t10,c12-CLA Isomer umgesetzt. Neben diesen konjugierten Doppelbindungen können noch weitere Doppelbindungen im Fettsäuremolekül enthalten sein, die nicht in Konjugation liegen. Im Prinzip können aber auch alle Doppelbindungen eines umgesetzten Fettsäuremoleküls in Konjugation sein. Die so hergestellten konjugierten und/oder nicht-konjugierten Fettsäuren können in die Membranen der Pflanz-

zenzellen und/oder in verschiedene Lipide z.B. in die Triglyceride eingebaut werden und im Samenöl gelagert werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch eine Lebensmittel-, Nahrungsergänzungsmittel-, Tierfuttermittel- oder Arzneimittelzubereitung, enthaltend konjugierte
5 mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen speziell enthaltend konjugierte Linolsäure.

Erfindungsgemäße Zubereitungen eignen sich hervorragend als Nahrungsmittel- oder Futterzusatz, z.B. in Diäten oder bei der Tiermast. So können diese in Kombination
10 oder auch alleine mit einer reduzierten Kalorienaufnahme zur Unterstützung einer Diät, z.B. zur Reduzierung des Körpergewichts beim Menschen, eingesetzt werden, die vorteilhaft auch die Essgewohnheiten beeinflusst. Die verbesserte Verwertung der zuge-
nommenen Nahrung führt zu einer Reduktion des Nahrungsmittelsverbrauchs, was besonders in wenig entwickelten Regionen mit Nahrungsmittelknappheit oder in Ex-
tremisituationen (Krankheiten, Leistungssport) vorteilhaft sein kann.

15 Erfindungsgemäße Zubereitungen können auch ökonomisch und ökologisch vorteilhaft in der Tierernährung, insbesondere für eine Reduzierung der Futtermenge eingesetzt werden.

Neben den konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen speziell der konjugierten Linolsäure können verschiedene
20 andere gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren z.B. Linolsäure, Linolensäure, Palmitinsäure enthalten sein. Insbesondere kann je nach Herstellungsverfahren der Anteil der verschiedenen Fettsäuren in den Ölen, Lipiden oder Fettsäuregemischen schwanken. Jedes Fettsäuremuster, ist von der erfindungsgemäßen Zubereitung umfasst, insbesondere Fettsäuremuster, die bei der Herstellung von Öl aus pflanzlichem Material
25 entstehen. Bevorzugt ist, dass die Öle, Lipide oder Fettsäuregemische eine möglichst geringe Streuung an unterschiedlichen Fettsäuren enthalten bzw. dass die Anzahl an verschiedenen Fettsäuren gering ist.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die genannte Zubereitung weitere Additive.

30 Unter dem Begriff "Additive" werden weitere für die Ernährung oder Gesundheit vorteilhafte Zusätze verstanden, z.B. "Nährstoffe" oder "Wirkstoffe". Die Zubereitung kann ein oder mehr Additive für die tierische oder menschliche Ernährung oder Behandlung enthalten und damit verdünnt oder gemischt werden. Additive können zusammen mit oder getrennt von dem Futtermittel, Nahrungsmittel, Nahrungsergänzungsmittel oder Arzneimittel verabreicht werden. Eine Lebensmittel-, Nahrungsergänzungsmittel-, Tierfuter-
35 ter- oder Arzneimittelzubereitung beinhaltet keine Additive oder keine Mengen von Additiven, die für die tierische oder menschliche Ernährung als schädlich angesehen werden können.

Unter "Nährstoffe" werden solche Zusätze verstanden, die für die Ernährung von Menschen oder Tieren vorteilhaft sind. Vorzugsweise enthält die erfindungsgemäße Zube-

5 reitung daher auch Vitamine, z.B. die Vitamine A, B1, B2, B6, B12, C, D3, und/oder E, Folsäure, Nicotinsäure, Pantothensäure, Taurin, Carboxylsäuren, z.B. Tricarbonsäuren, Citrat, Isocitrat, trans/cis Aconitat, und/oder homo-Citrat, Enzyme, z.B. Phytasen, Carotinoide, Mineralien, z.B. P, Ca, Mg, Mn und/oder Fe, Proteine, Kohlenhydrate, Fette, Aminosäuren und/oder Spurenelemente Sn. Die Zubereitung kann auch Brenztraubensäure, L-Carnitin, Liponsäure, Coenzyme Q10, Aminocarbonsäuren, wie z.B. Kreatin, enthalten.

10 Unter "Wirkstoffe" werden solche Stoffe verstanden, die die Anwendung der erfindersichen Zubereitung als Arzneimittel unterstützen oder deren Wirkung der Behandlung von Krankheiten, insbesondere der Behandlung von Krebs, Diabetes, AIDS, Allergien und kardiovaskuläre Erkrankungen, dient (s. auch unten).

15 Folglich kann die erfindungsgemäße Zubereitung auch Konservierungsstoffe, Antibiotika, antimikrobielle Zusätze, Antioxidantien, Chelatbildner, inerte Gase, physiologisch unbedenkliche Salze usw. umfassen. Der Fachmann weiß die für die jeweilige Verwendung als Arzneimittel, Tierfutter, Nahrungsergänzungsmittel oder Lebensmittel-Zusatz geeigneten Additive der Zubereitung hinzuzufügen oder durch einfache, im Stand der Technik bekannte Tests zu ermitteln.

20 Unter "Additiven" werden auch Antioxidationsmittel verstanden. Antioxidationsmittel sind z.B. vorteilhaft, um die Doppelbindungen der Fettsäuren vor Oxidation zu schützen. Jedoch ist auch die allgemeine gesundheitsfördernde Wirkung von Antioxidationsmitteln bekannt. So wird in der Tierernährung als Antioxidationsmittel Ethoxyquin verwendet, ansonsten werden auch gamma- und alpha-Tocopherole, Tocotrienol, Rosmarinextrakt, natürlich vorkommende Polyphenole, z.B. Flavonoide, Isoflavone und Carotinoide eingesetzt.

25 In einer weiteren Ausführungsform enthält die genannte Zubereitung weitere vielfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs). Unter dem Begriff "Fettsäure" wird eine unverzweigte Carbonsäure mit geradzahlig Kohlenstoffzahl und 12 bis 22 vorteilhaft 16 bis 22 Kohlenstoffatomen verstanden. Unter "ungesättigter Fettsäure" wird erfindungsgemäß eine Fettsäure mit mindestens zwei Doppelbindungen verstanden. Unter "konjugierter, ungesättigter Fettsäure" wird hierin eine ungesättigte Fettsäure mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen, die in Konjugation zu einander stehen, verstanden. Vorzugsweise enthält die Zubereitung Omega-3-Fettsäuren, z.B. Alpha-Linolensäure, Docosatriensäure, Docosatetraensäure, Docosahexaensäure, Docosapentaensäure, und/oder Eicosatriensäure, Eicosatetraensäure, Eicosapentaensäure, Dimorphencol-
35 säure, Parinarsäure, und/oder bevorzugt konjugierte Linolensäure.

Den genannten Zubereitungen können auch Geschmacksstoffe zugesetzt sein.

40 In Lebensmitteln kann die Zubereitung mit üblichen Nahrungskomponenten kombiniert werden. Diese umfassen pflanzliche aber auch tierische Produkte, insbesondere Zucker gegebenenfalls in Form von Sirups, Fruchtzubereitungen, wie Fruchtsäfte, Nektar, Fruchtpulpen, Pürees oder getrocknete Früchte; Getreideprodukte sowie Stärken der

genannten Getreide; Milchprodukte, wie Milcheiweiß, Molke, Joghurt, Lecitin und Milchzucker.

In einer Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Zubereitung für Verwendung in der Tierernährung geeignet und enthält z.B. Zuschlagstoffe.

- 5 Unter "Zuschlagstoffen" werden Stoffe verstanden, die der Verbesserung der Produkteigenschaften, wie Staubverhalten, Fließeigenschaften, Wasseraufnahmefähigkeit und Lagerstabilität dienen. Beispiele für solche Zuschlagstoffe und/oder Mischungen davon können auf der Basis von Zuckern z.B. Lactose oder Maltodextrin, auf der Basis von Getreide- oder Hülsenfruchtprodukten z.B. Maisspindelmehl, Weizenkleie und Soja-
- 10 schrot, auf der Basis von Mineralsalzen u.a. Calcium-, Magnesium-, Natrium-, Kaliumsalze oder auf der Basis von Kieselsäuren wie Kieselgel sein.

- Unter dem Begriff "Öl" oder "Fett" wird ein Fettsäuregemisch verstanden, das ungesättigte, gesättigte, vorzugsweise veresterte Fettsäure(n) enthält. Bevorzugt ist, dass das Öl oder Fett einen hohen Anteil an ungesättigter, konjugierter und/oder nicht-
- 15 konjugierter veresteter Fettsäure(n), insbesondere konjugierter Linolsäure aber auch anderen ungesättigten Fettsäuren wie beispielsweise γ -Linolensäure, Dihomo- γ -linolensäure, Arachidonsäure, α -Linolensäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure hat. Vorzugsweise ist der Anteil an ungesättigten konjugierten und/oder nicht-konjugierten mehrfach ungesättigten veresterten Fettsäuren mit
- 20 mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen ungefähr 30 Gew.-%, mehr bevorzugt ist ein Anteil von 50 Gew.-%, noch mehr bevorzugt ist ein Anteil von 60 Gew.-%, 70 Gew.-%, 80 Gew.-% oder mehr. Zur Bestimmung kann z.B. der Anteil an Fettsäure nach Überführung der Fettsäuren in die Methylestern durch Umesterung gaschromatographisch bestimmt werden. Das Öl oder Fett kann weiterhin verschiedene andere
- 25 gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, z.B. CLA, Palmitin-, Stearin-, Linol-, Linolen-, Ölsäure etc., enthalten. Insbesondere kann je nach Ausgangsorganismus speziell nach Ausgangspflanze der Anteil der verschiedenen Fettsäuren in dem Öl oder Fett schwanken.

- 30 Die im Verfahren hergestellten konjugierten und/oder nicht konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen können in den eukaryontischen transgenen Organismen in Form ihrer Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide, Monoacylglycerin, Diacylglycerin, Triacylglycerin oder sonstige Fettsäureester oder in Form der freien Fettsäure vorliegen.

- 35 Aus den so im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen lassen sich die enthaltenden konjugierten und/oder nicht konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen und/oder weitere Fettsäuren beispielsweise über eine Alkalibehandlung beispielsweise wässrige KOH oder NaOH oder saure Hydrolyse vorteilhaft in Gegenwart eines Alkohols wie Methanol
- 40 oder Ethanol oder über eine enzymatische Abspaltung freisetzen und isolieren über beispielsweise Phasentrennung und anschließender Ansäuerung über z.B. H_2SO_4 . Die

Freisetzung der Fettsäuren kann auch direkt ohne die vorhergehend beschriebene Aufarbeitung erfolgen.

Werden die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten konjugierten und/oder nicht konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei
5 Doppelbindungen in Futtermitteln verabreicht, so können sie einzeln oder in Kombination mit anderen Stoffen im Futtermittel verabreicht werden, die aktiven Verbindungen z.B. die vorgenannten Fettsäuren können als Reinsubstanz oder Stoffgemische oder flüssige oder feste Extrakte zusammen mit üblichen weiteren Futtermittelbestandteilen oder anderen aktiven Verbindungen wie Vitamine, Carotinoide etc. verabreicht werden.
10 Beispiele üblicher Futtermittelbestandteile sind: Mais, Gerste, Weizen, Hafer, Roggen, Triticale, Sorghum, Reis und Kleien, Grieskleien sowie Mehle dieser Getreidearten, Sojabohnen, Sojaprodukte wie Sojaextraktionsschrot, Raps, Rapsextraktionsschrot, Baumwollsaat und Extraktionsschrot, Sonnenblumen, Sonnenblumenextraktionsschrot, Leinsaat, Leinextraktionsschrot, Expeller von Ölsaaten, Ackerbohnen, Erbsen, Gluten,
15 Gelatine, Tapioka, Hefen, Single Cell Protein, Fischmehl, Salze, Mineralstoffe, Spurenelemente, Vitamine, Aminosäuren, Öle/Fette und dergleichen. Vorteilhafte Zusammensetzungen werden z.B. in Jeroch, H. et al. Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere, UTB beschrieben.

Die erfindungsgemäße Zubereitung kann als Pulver, Granulat, Pellet, Extrudate mit
20 einem Überzug versehen ("coated") und/oder als Kombinationen davon vorliegen. Die Zubereitung des erfindungsgemäßen Tierfutters, beispielsweise durch umhüllende Verbindungen, dient z.B. zur Verbesserung der Produkteigenschaften, wie Staubverhalten, Fließeigenschaften, Wasseraufnahmefähigkeit und Lagerstabilität. Solche Zubereitungen sind im Stand der Technik weitreichend bekannt. So werden in der Tierer
25 nährung z.B. Blöcke aus einer festen, kohesiven, die Form behaltenden Masse von mehreren Kilos verwendet.

Tierernährungen werden so zusammengesetzt, dass der entsprechende Bedarf an Nährstoffen für die jeweilige Tierart optimal gedeckt wird. Im allgemeinen werden pflanzliche Futtermittelkomponenten wie Mais-, Weizen- oder Gerstenschrot, Soja-
30 vollbohnsenschrot, Sojaextraktionsschrot, Leinextraktionsschrot, Rapsextraktionsschrot, Grünmehl oder Erbsenschrot als Rohproteinquellen gewählt. Um einen entsprechenden Energiegehalt des Futtermittels zu gewährleisten, werden Sojaöl oder andere tierische oder pflanzliche Fette zugegeben. Da die pflanzlichen Proteinquellen einige essentielle Aminosäuren nur in unzureichender Menge beinhalten, werden Futtermittel
35 häufig mit Aminosäuren angereichert. Hierbei handelt es sich vor allem um Lysin, Methionin und/oder Threonin. Um die Mineralstoff- und Vitaminversorgung der Nutztiere zu gewährleisten, werden außerdem Mineralstoffe und Vitamine zugesetzt. Die Art und Menge der zugesetzten Mineralstoffe und Vitamine hängt von der Tierspezies ab und ist dem Fachmann bekannt (s. z.B. Jerosch et al., Ernährung landwirtschaftlicher
40 Nutztiere, Ulmer, UTB). Zur Deckung des Nährstoff- und Energiebedarfs können Alleinfutter verwendet werden, die alle Nährstoffe im bedarfsdeckenden Verhältnis zueinander enthalten. Es bildet das einzige Futter der Tiere. Alternativ kann zu einem

Körnerfutter aus Getreide ein Ergänzungsfutter gegeben werden. Hierbei handelt es sich um eiweiß-, mineralstoff- und vitaminreiche Futtermischungen, die das Körnerfutter sinnvoll ergänzen.

5 Weiter betrifft die Erfindung eine erfindungsgemäße Zubereitung, die ein Arzneimittel ist.

Eine verbesserte Nahrungsumsetzung wie sie beispielsweise für CLA beobachtet wurde und für konjugierte mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Calendulasäure ebenfalls anzunehmen ist, kann bei durch eine Krankheit geschwächten Personen oder Tieren beispielsweise zu einer schnelleren Genesung führen.

10 Das unter Verwendung der erfindungsgemäßen Zubereitung hergestellte Arzneimittel kann daher auch zur Behandlung von Krebs, kardiovaskulären Erkrankungen, z.B. Arteriosklerose (MacDonald, J.J. American College of Nutrition, (2000) 19, 111S-118S), Diabetes (WO99/29317), Allergien und für Krankheiten begleitende Diäten eingesetzt werden.

15 Vorteilhaft ist somit z.B. der Einsatz der genannten Zubereitung zum beschleunigten Körperaufbau, z.B. nach einer längeren Krankheit, die mit Gewichtsverlust einhergeht, z.B. einer Chemotherapie, und zur Unterstützung oder Beschleunigung des Genesungsprozesses.

20 Das Arzneimittel kann weiterhin andere Wirkstoffe, z.B. die oben genannten oder anderen, enthalten. Die Wirkstoffe können zur Behandlung von Krebs, kardiovaskuläre Erkrankungen, z.B. Arteriosklerose, Diabetes, Allergien und der Unterstützung von Diäten dienen oder die Wirkung der erfindungsgemäßen Zubereitung verbessern. Ein Arzneimittel zur Behandlung von Diabetes kann z.B. Insulin, Sulfonylharnstoffe, Sulfonamide, Liponsäure, γ -Glucosidase-Hemmer, Thiazolidindione, Metformin und/oder Acetylsalicylsäure enthalten. Krebserkrankungen werden z.B. durch die Zugabe von Zytostatika wie Vinca-Alkaloide, Alkylantien, wie z.B. Chlorambucil, Melphalan, Thio-TEPA, Cyclophosphamid, etc., durch Folsäureanaloge, wie Aminopterin oder Methotrexat, oder durch die Zugabe von Immunsuppressiva, wie z.B. Cyclophosphamid und Azathioprin, Glucocorticoide, wie Prednisolon, oder Cyclosporin behandelt. HIV-Infektionen oder AIDS kann z.B. durch die Gabe von Reverse Transkriptase-Inhibitoren und/oder Protease-Inhibitoren behandelt werden. Allergien werden z.B. behandelt in dem die Mastzellen stabilisiert werden, z.B. durch Cromoglyxat, durch Blockade der Histamin-Rezeptoren, z.B. durch H1-Antihistaminika, oder durch funktionelle Antagonisten der Allergiemediatoren, z.B. durch alpha-Sympathomimetika, Adrenalin, beta2-

25
30
35

Sympathomimetika, Theophyllin, Ipratropium oder Glucocorticoide. Kardiovaskuläre Erkrankungen werden mit Hilfe von Gerinnungshemmern, ACE-Inhibitoren, Cholesterolsenker wie Steatine und Fibrate, Niacin, Cholestyramin behandelt.

40 Das Arzneimittel kann einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen. Beispiele für geeignete pharmazeutisch verträgliche Träger sind im Stand der Technik bekannt und schließen physiologisch unbedenkliche Salze, z.B. Phosphat gepufferte Salzlö-

sungen, Wasser, Emulsionen, wie z.B. Öl/Wasseremulsionen, sterile Lösungen etc. Sterile Lösungen können z.B. wässrige oder nicht-wässrige Lösungen sein. Wässrige Lösungen sind z.B. Wasser, Alkohol/Wasser-Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen und schließen Natriumchloridlösungen, Ringers Dextrose, Dextrose und Natriumchlorid etc. ein. Beispiele für nicht-wässrige Lösungen sind Proylene, Glykol, Polyethylenglykol, pflanzliche öle, organische Ester, z.B. Ethyloleat. Weiterhin kann das Arzneimittel eins der oben genannten, geeigneten Additive umfassen.

Arzneimittel können in üblicher Weise oral oder parenteral (subkutan, intravenös, intramuskulär, intraperitoneal) verabreicht werden. Die Applikation kann auch mit Dämpfen oder Sprays durch den Nasen-Rachenraum erfolgen.

Die Dosierung hängt vom Alter, Zustand und Gewicht des Patienten sowie von der Applikationsart ab. In der Regel beträgt die tägliche Wirkstoffdosis zwischen etwa 0,05 und 100 mg/kg Körpergewicht bei oraler Gabe und zwischen etwa 0,01 und 20 mg/kg Körpergewicht bei parenteraler Gabe. Besonders bevorzugt sind 0,5 bis 50 mg/kg.

Die neuen Zubereitungen können in den gebräuchlichen galenischen Applikationsformen fest oder flüssig angewendet werden, z.B. als Tabletten, Filmtabletten, Kapseln, Pulver, Granulate, Dragees, Suppositorien, Lösungen, Salben, Cremes oder Sprays. Diese werden in üblicher Weise hergestellt. Die Wirkstoffe können dabei mit den üblichen galenischen Hilfsmitteln wie Tablettenbindern, Füllstoffen, Konservierungsmitteln, Tablettsprengmitteln, Fließregulierungsmitteln, Weichmachern, Netzmitteln, Dispergiermitteln, Emulgatoren, Lösungsmitteln, Retardierungsmitteln, Antioxidantien und/oder Treibgasen verarbeitet werden (vgl. H. Sucker et al.: Pharmazeutische Technologie, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1991). Die so erhaltenen Applikationsformen enthalten Wirkstoffe, einschließlich CLA oder -Öl, normalerweise in einer Menge von 0,1 bis 90 Gew.-%.

Ein erfindungsgemäßes Arzneimittel kann z.B. hergestellt werden, indem Rohextrakte von Pflanzen, die konjugierte mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie CLA enthalten, gewonnen und formuliert werden. Standardherstellungsverfahren für Arzneimittel sind dem Fachmann hinreichend bekannt.

Je nach Zweck muss die Menge der eingesetzten konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen wie trans/cis konjugierte Linolsäure angepasst werden. Die Menge der eingesetzten vorgenannten Fettsäuren kann z.B. 0,01 % oder 0,1 % der bei der Ernährung zugesetzten Fettmenge darstellen. Ebenfalls bevorzugt sind 0,5 %, 1 %, 2 % oder 3 %, 5 % oder 10 % der konjugierten und/oder nicht-konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen. Diese Mengenangaben können auch noch weitere andere Fettsäuren mit umfassen.

Als transgener Organismus für das erfindungsgemäße Verfahren kommen prinzipiell alle eukaryontischen nicht-humane Organismen in Frage. Vorteilhafterweise werden als Organismus Mikroorganismen wie Pilze oder Hefen oder Pflanzen wie Algen, Moo-

se, Monokotyledonen oder Dikotyledonen verwendet, vorteilhaft handelt es sich dabei um Öl-produzierende Organismen. Im Falle der Verwendung von Pflanzen im Verfahren handelt es sich vorteilhaft um sogenannte Ölfuchtpflanzen, Fruchtpflanzen, Nutzpflanzen oder sonstige Pflanzen.

- 5 Das Einbringen der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäure(n) [der Plural soll für die hier beschriebene Erfindung den Singular mit umfassen und vice versa], der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des Nukleinsäurekonstrukts oder des Vektors in einen eukaryontischen transgenen Organismen beispielsweise einer Pflanze kann prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.
- 10 Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F.M. Ausubel et al. (1994) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., *DNA Cloning Vol.1*, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Guthrie et al. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, *Methods in Enzymology*, 1994, Academic Press entnehmen.
- 15

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, die Verwendung einer Genkanone, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization*, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225 beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt bzw. die zu exprimierende Nukleinsäure in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711). Die Transformation von Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* wird beispielsweise von Höfgen und Willmitzer in *Nucl. Acid Res.* (1988) 16, 9877 beschrieben.

20

25

30

Mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformierte *Agrobacterien* können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie Arabidopsis und Tabak oder Kulturpflanzen, insbesondere von Öl-haltigen Kulturpflanzen, wie Soja, Erdnuss, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*), Canola, Mohn, Senf, Hanf, Olive, Sesam, Calendula, Punica, Nachtkerze, Königskerze, Distel, Wildrosen, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Pistazien, Borretsch, Walnuss, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Kartoffel, Tabak, Aubergine, Tomate, Erbse, Alfalfa, Kaffee, Tee oder Kakaobohne verwendet werden,

35

40

z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten
5 Schriften von S.D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure, das Nukleinsäurekonstrukt oder den Vektor eignen sich prinzipiell alle eukaryontischen Organismen, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu syn-
10 thetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielhaft seien Pflanzen wie Arabidopsis, Asteraceae wie Calendula oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuss, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze beispielsweise die Gattung *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Hefen wie die
15 Gattung *Saccharomyces*, Algen oder Protozoen wie Dinoflagellaten wie *Cryptocodinium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersaflor, Rizinus, Calendula, Erdnuss, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*,
20 besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Lein, Sonnenblume, Calendula oder *Saccharomyces cerevisiae*. Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene nicht-humane Tiere beispielsweise *C. elegans* geeignet.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren können nach Einbringung in eine Pflanzenzelle bzw. Pflanze entweder auf einem separaten Plasmid liegen oder in das Ge-
25 nom der Wirtszelle integriert sein. Bei Integration in das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein oder durch derartige Rekombination erfolgen, dass das native Gen oder ein anderes natives Gen, das im Nukleinsäurekonstrukt (siehe unten) enthalten ist, durch die eingebrachte Kopie ersetzt wird, wodurch die Produktion
30 der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert wird, oder durch Verwendung eines Gens in trans, so dass das Gen mit einer funktionellen Expressionseinheit, welche mindestens eine die Expression eines Gens gewährleistende Sequenz und mindestens eine die Polyadenylierung eines funktionell transkribierten Gens gewährleistende Sequenz enthält, funktionell verbunden ist. Vorteilhaft werden die Nukleinsäuren über Multiexpressionskassetten oder Konstrukte zur multiparallelen Expression
35 von Genen in die transgenen Organismen wie Pflanzen eingebracht. Im Falle von Pflanzen ist eine samenspezifische Expression vorteilhaft.

Unter der Verwendung von Klonierungsvektoren in Pflanzen und bei der Pflanzentransformation, wie denjenigen, die in den folgenden Schriften veröffentlicht sind bzw. dort zitiert sind: *Plant Molecular Biology and Biotechnology* (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und

R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225), lassen sich die Nukleinsäuren zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Pflanzen verwenden, so dass diese ein besserer oder effizienterer Produzent eines oder mehrerer von Lipiden hergeleiteter Produkte wird, wie PUFAs speziell konjugierte und/oder nicht-konjugierte mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen. Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion eines von Lipiden hergeleiteten Produktes, wie die vorgenannten PUFAs, kann durch direkte Wirkung der Manipulation oder eine indirekte Wirkung dieser Manipulation hervorgerufen werden.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung eines Isomerase-Proteins die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einer Ölfuchtpflanze oder einem Mikroorganismus aufgrund eines veränderten Proteins direkt beeinflussen kann. Die Anzahl oder Aktivität des Isomerase-Proteins oder -Gens sowie von Genkombinationen von verschiedenen Isomerasen kann erhöht sein, so dass größere Mengen dieser Verbindungen de novo hergestellt werden, weil den Organismen diese Aktivität und Fähigkeit zur Biosynthese vor dem Einbringen des entsprechenden Gens fehlte. Entsprechendes gilt für die Kombination mit weiteren Enzymen aus dem Lipidstoffwechsel. Auch die Verwendung verschiedener divergenter, d.h. auf DNA-Sequenzebene unterschiedlicher Sequenzen kann dabei vorteilhaft sein bzw. die Verwendung von Promotoren zur Genexpression, die eine andere zeitliche Genexpression z.B. abhängig vom Reifegrad eines Samens oder Öl-speichernden Gewebes ermöglicht.

Für das erfindungsgemäße beschriebene Verfahren ist es vorteilhaft, in den Organismus in Verfahrensschritt (a) zusätzlich mindestens eine weitere Nukleinsäure einzubringen, die für ein Polypeptid mit Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe einer Δ -5-Desaturase, einer Δ -6-Desaturase, einer Δ -8-Desaturase oder Δ -12-Desaturase.

Für das beschriebene Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen beispielsweise aus Linolsäure oder Linolensäure ist neben den erwähnten Isomerasen (= SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6) eine weitere Δ -12-Desaturase vorteilhaft, durch die die Menge an Ausgangsprodukt der Isomerisierungsreaktion erhöht werden kann. Um eine breite Palette an mehrfach ungesättigten Fettsäuren zugänglich zu machen können vorteilhaft weitere Gene für Enzyme wie Desaturase wie für eine Δ -4-Desaturase, eine Δ -5-Desaturase, eine Δ -6-Desaturase und/oder eine Δ -8-Desaturase oder Elongase wie eine Δ -5-Elongase, eine Δ -6-Elongase und/oder Δ -9-Elongase in die Wirtsorganismen eingebracht werden.

23

Die Bildung von Konjudien und/oder Konjutrien Fettsäuren beispielsweise aus Linolsäure, Linolensäure und/oder Dihomo- γ -Linolensäure ist besonders vorteilhaft aus Ölsaaten wie Soja, Sonnenblume, Safflower oder vorteilhaft Lein möglich, die einen kostengünstigen und einfachen Zugang zu Konjudien und/oder Konutrien durch ihren hohen Gehalt an Linolsäure und/oder Linolensäure ermöglichen. Um Raps, der einen hohen Ölsäuregehalt hat, für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhaft verwenden zu können, muss zusätzlich zur Isomerase noch eine weitere enzymatische Aktivität (Δ -12-Desaturase) in die Pflanze eingebracht werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit Isomeraseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

- h) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 dargestellten Sequenz, oder
 - i) einer Nukleinsäuresequenz, die sich durch Rückübersetzung in eine Nukleinsäuresequenz von der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenz aufgrund des degenerierten genetischen Codes ableitet, oder
 - j) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 90 % Identität auf Aminosäureebene aufweisen, oder
 - k) einer Nukleinsäuresequenz, die sich von dem prokaryontischen codon-usage der Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 11 durch mindestens 0,5 %, vorteilhaft mindestens 1, 2, 3 oder 5 % bevorzugt mindestens 6, 7, 8, 9 oder 10 %, besonders bevorzugt mindestens 20, 30, 40 oder 50 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 60, 70, 80 oder 90 % eines eukaryontischen codon-usage unterscheidet, oder
 - l) Derivate der unter (d) beanspruchten Nukleinsäuresequenzen, die um mindestens ein, vorteilhaft mindestens 2, bevorzugt mindestens 3, besonders bevorzugt mindestens 4, ganz besonders bevorzugt mindestens 5 - Codontripletts vorteilhaft am 5' Ende der Nukleinsäuresequenzen, die für eine Aminosäure codieren, verlängert ist, ohne dass die enzymatische Wirkung der durch die Nukleinsäuren codierten Polypeptide wesentlich verändert ist.
- Unter Derivaten bzw. funktionellen Derivaten der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 genannten Sequenz sind wie oben beschrieben beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 90 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, bevorzugt mindestens 95 % Homologie, besonders bevorzugt mindestens 96, 97 oder 98 % Homologie, ganz besonders bevorzugt 99; 99,5; 99,6; 99,7; 99,8; 99,9

oder 99,95 % Homologie aufweisen. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981))], die im GCG Software-Paket [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in
5 Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm BestFit über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 8, Length Weight: 2. Unter Homologie ist für die vorliegende Erfindung Identität zu verstehen. Beide Begriffe sind synonym. Die von den genannten Nukleinsäuren abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind Sequenz SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 zu entnehmen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten; die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1,
10 SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine sowie das eukaryontische Codon-usage erhalten bleibt.

Solche DNA-Sequenzen lassen sich ausgehend von den in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 beschriebenen DNA-Sequenzen oder Teilen dieser Sequenzen, beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Organismen wie oben genannt isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den genannten Sequenzen. Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide beispielsweise der konservierten Bereiche, die über Vergleiche mit anderen Isomerasegenen in dem Fachmann bekannterweise ermittelt
20 werden können, verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure: Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen.
25 So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge. Unter Standardbedingungen sind Bedingungen zu verstehen, wie sie in dieser Beschreibung weiter oben offenbart wurden.

Vorteilhaft weisen die unter Punkt (b) genannten Nukleinsäuresequenzen eine möglichst geringe Abänderung des codon-usage auf, da diese wenigen Änderungen schon den erfinderischen Effekt aufweisen, das heißt die Expression der Nukleinsäuresequenzen in den eukaryontischen Organismen ermöglichen und da je weniger Änderungen des codon-usage in die Sequenzen eingefügt werden müssen, desto einfacher lassen sich diese Sequenzen in vitro erzeugen. Vorteilhaft sollten die Änderungen in
35 einem Bereich von 0,5 bis 99 %, vorteilhaft zwischen 0,5 bis 90 %, bevorzugt zwischen 1 bis 50 %, besonders bevorzugt zwischen 1 bis 40 %, ganz besonders bevorzugt zwischen 1 bis 20 % der gesamten Sequenz liegen. Bevorzugt werden diese Änderungen am Aminoterminalen Ende bzw. 5'-Ende der Sequenzen eingefügt. Es ist aber auch
40

eine Änderung an anderer Stelle möglich, beispielsweise am C-Terminus oder innerhalb der Sequenz oder an mehreren Stellen innerhalb der Sequenz.

Der mRNA-instruierte Vorgang der Translation in ein Protein wird durch den codon-usage eines jeden speziellen Organismus beeinflusst. Wobei die Funktion $f(x) \rightarrow y$, mit x aus der Menge der Codonen, des genetischen Codes, y aus der Menge der Aminosäuren notiert werden, hierbei ist f eine Funktion, die jedes Codon genau auf eine Aminosäure abbildet. Diese Abbildung erfolgt im Sinne der Mathematik nicht eineindeutig, das heißt mehrere Codonen codieren für dieselbe Aminosäure. Der genetische Code wird deshalb als degeneriert bezeichnet, da einige Aminosäuren durch mehrere (synonyme) Codonen codiert werden. Nicht für jedes Codon existiert eine spezifische tRNA, an Position eins des Anticodons können modifizierte Basen eingebaut sein und im Codon/Anticodon-Komplex sind an der dritten Position des Codons Fehlpaarungen erlaubt (Crick'sche Wobble-Regel). Der Informationsgehalt der drei Basenpositionen im Codon ist nicht gleich, es gilt der höchste Informationsgehalt ist in Position 2, danach folgt Position 1 gefolgt von Position 3. Deshalb verändert eine Mutation der dritten Base im Codon die Aminosäurenkomposition häufig nicht, eine Mutation in der ersten Basenposition führt häufig zum Einbau einer Aminosäure mit ähnlichen Eigenschaften, eine Mutation der mittleren Base verursacht häufig den Einbau einer Aminosäure mit anderen Eigenschaften. Die geringsten Auswirkungen auf die Aminosäurenkomposition der Proteine haben somit Veränderungen der Basenkomposition in Position drei des Codons, gefolgt von Veränderungen der Basenkomposition an Position eins. Trotzdem ist der genetische Code quasi universell, abweichende Codonzuordnungen finden sich jedoch z.B. bei Mitochondrien, Mycoplasma und einigen Protozoen. Die Häufigkeit, mit der Codonen in Genen vorkommen, schwankt zwischen den taxonomischen Gruppen beträchtlich. Die Codonpräferenzen von *E. coli* und *Salmonella typhimurium* sind sich relativ ähnlich, die der von ihnen taxonomisch entfernte Gattung *Bacillus* speziell die Spezies *B. subtilis* weichen von beiden stark ab. Innerhalb des genetischen Codes gibt es synonyme Codonen, die für dieselbe Aminosäure codieren. Die Verwendung dieser synonymen Codonen in den verschiedenen Organismen erfolgt nicht mit vergleichbarer Häufigkeit, das heißt einige werden bevorzugt eingebaut. Zusätzlich variiert die Codon-Häufigkeiten noch innerhalb einer Spezies zwischen verschiedenen Genen, je nachdem wie stark diese Gene exprimiert werden sollen. In bestimmten Genen tritt spezies-spezifisch eine Teilmenge der Codonen bevorzugt auf. Diese Verzerrung der Codon-Häufigkeiten ist, wie gesagt, positiv korreliert mit der Genexpression. Mögliche Ursachen für diese Verzerrung der Codon-Häufigkeiten sind die unterschiedlichen Konzentrationen der tRNAs, die Aufrechterhaltung der maximalen Elongationsrate, die Kosten für das Korrekturlesen sowie unterschiedliche Translationsraten der Codonen etc.. Diese Verzerrung der Codon-Häufigkeiten wird als "Strategie" interpretiert, die Wachstumsraten zu optimieren. Da in den verschiedenen Organismen ein unterschiedlicher Codongebrauch für dieselbe Aminosäure verwendet wird, das heißt die Codonen anders abgebildet werden, gibt es bei der Expression einer definierten aus einem Organismus stammenden Sequenz in einem anderen Organismus immer wieder unvorhersehbare Überraschungen, das heißt eine Sequenz kann plötzlich deutlich stärker oder schwächer oder gar nicht mehr exprimiert werden. Häufig erfolgt auch trotz Anpassung

des genetischen Codes der Sequenzen auf den Wirtsorganismus keine Expression der Sequenzen. Um so unerwarteter war es, dass die erfindungsgemäßen Sequenzen schon nach einer Änderung von ca. 0,5 % der Codonen exprimiert wurden. Da der genetische Code dem Fachmann geläufig ist ebenso wie der Codongebrauch unterschiedlicher Gattungen und Arten und da für die Codonanpassung Algorithmen zur Verfügung stehen, kann er eine Anpassung der erfindungsgemäßen Sequenz an das condon-usage des Wirtsorganismus vornehmen. Beispiele für eine derartige Übersetzung sind den verwendeten Primern I und II zu entnehmen.

Vorteilhaft wird zur Verbesserung der Expression der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 und SEQ ID NO: 11 in einem transgenen (Wirts)organismus die Sequenz in der Weise verändert, dass der codon-usage nach dem Startcodon so verändert wird, dass er optimal an den codon-usage des zur Expression verwendeten eukaryontischen nicht-humanen Organismus angepasst ist und dadurch optimal exprimiert wird. Diese Veränderung kann vorteilhaft mit Hilfe der folgenden Primer erfolgen, wobei die Primer I vorteilhaft für die Veränderung der Bifidobakteriumsequenz (SEQ ID NO: 9) und die Primer II vorteilhaft für die Veränderung der Lactobacillussequenz (SEQ ID NO: 11) verwendet werden:

Primer I:

BBI-KpnIa: GGT ACC ATG GGT TAC TAC TCC TCC GGT AAC TAC GAA GCT
TTC GCT AGA CCA AAG AAG CCA GCT GGT GTT G (5'Primer)

BBI-XhoIb: CTC GAG CAG ATC ACA TGG TAT TCG CGT AGC AG (3'Primer)

Primer II:

LRI-EcoRIa: GAA TTC ACC ATG GGT TAC TAC TCC AAC GGT AAC TAC GAA
GCT TTC GCT AGA CCA AAG AAG CCA GCT GGT G (5'Primer)

LRI-XhoIb: CTC GAG TTA TAG TAA GTG CTG TTG CTC CAT TAA TTC (3'Primer)

Der zur Veränderung von SEQ ID NO: 7 (Propionibakteriumsequenz) verwendete Primer ist den Beispielen zu entnehmen. Die korrespondierenden Aminosäuresequenzen der Sequenzen SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 und SEQ ID NO: 11 sind den Sequenzen SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 und SEQ ID NO: 12 zu entnehmen.

Durch diese Veränderung des codon-usage wird eine zusätzliche Aminosäure in die Aminosäuresequenzen eingefügt (siehe SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 6), wobei jedoch die sonstige Aminosäuresequenz erhalten bleibt. Weiterhin wird eine Schnittstelle in die Nukleinsäure(n) für ein Restriktionsenzym eingefügt. Die Veränderung führt zu folgenden geänderten Nukleinsäuresequenzen:

BBI (Bifidobacteriumsequenz):

atgggttactactcctccgtaactacgaagcttcgctagaccaagaagccagctggtgttg (modifiziert)

atg---tactacagcagcggcaactatgaggcggttgcctccgaagaagccagccggcgtag (Original)

LRI (Lactobacillussequenz):

atgggttactactccaacggtaactacgaagccttcgctagaccaaagaagccagctgggtg (modifiziert)

atg---tattattcaaacgggaattatgaagccttcgctagaccaaagaagcctgctggcg..(Original).

- 5 Für eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist es vorteilhaft für eine optimale Expression heterologer Gene in einem Organismus die Nukleinsäuresequenzen entsprechend des im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" vollständig zu verändern. Dies führt vorteilhaft zu einer weiteren Steigerung der Expression. neben der Sequenzveränderung über den vorgenannten Primer.
- 10 Die unter Punkt (c) beschriebenen Nukleinsäuresequenzen weisen vorteilhaft nur ein weiteres Codontriolett auf. Dies führt zu einer um eine Aminosäure verlängerte Aminosäuresequenz der Isomerase. Prinzipiell ist auch eine Veränderung der Sequenz ohne eine Verlängerung der Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz möglich. Im vorliegenden Fall wurde durch die Verlängerung eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym in
- 15 die Sequenz eingeführt. Diese Schnittstelle kann aber auch außerhalb der codierenden Sequenz eingefügt werden.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist eine Aminosäuresequenz codiert durch die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, oder SEQ ID NO: 5 bzw. deren vorgenannte Derivate. Diese Aminosäuresequenzen sind

20 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder zu entnehmen.

Unter Derivate(n) im erfindungsgemäßen Verfahren bzw. zur erfindungsgemäßen Nukleinsäure sind beispielsweise funktionelle Homologe der von SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 codierten Enzyme oder deren enzymatischer Aktivität, d.h. Enzyme, die dieselben enzymatischen Reaktionen wie das von SEQ ID NO: 1, SEQ ID

25 NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 codierte Enzym katalysieren, zu verstehen. Diese Gene ermöglichen ebenfalls eine vorteilhafte Herstellung ungesättigter konjugierter Fettsäuren.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen oder Fragmente davon können vorteilhaft zur Isolierung weiterer genomischer Sequenzen über Homologiescreening verwendet werden.

- 30 Die genannten Derivate lassen sich beispielsweise aus anderen Organismen wie Mikroorganismen des Pansens von Wiederkäuern, dem Darm anderen Tiere oder aus Starterkulturen von Molkereiprodukten oder Silagen isolieren. Vorteilhafte Derivate bzw. Homologe lassen sich Mikroorganismen wie Pilzen, Hefen, Protozoen oder Bakterien wie gram-negativen oder gram-positiven Bakterien, bevorzugt aus gram-positiven
- 35 Bakterien wie beispielsweise aus den Gattungen Propionibakterium, Lactococcus, Bifidobacterium oder Lactobacillus, besonders bevorzugt aus den Gattungen Lactobacillus oder Bifidobacterium isolieren.

Weiterhin sind unter Derivaten bzw. funktionellen Derivaten der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 genannten Sequenz beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 90 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, bevorzugt mindestens 95 % Homologie, besonders bevorzugt mindestens 96, 97 oder 98 % Homologie, ganz besonders bevorzugt 99; 99,5; 99,6; 99,7; 99,8; 99,9 oder 99,95 % Homologie aufweisen. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)), die im GCG Software-Paket [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm BestFit über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 8, Length 10 Weight: 2. Der Homologievergleich wurde mit dem Programm Unter Homologie ist für die vorliegende Erfindung Identität zu verstehen. Beide Begriffe sind synonym. Die von den genannten Nukleinsäuren abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind Sequenz SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 zu entnehmen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine sowie das eukaryontische Codon-usage erhalten bleibt.

Solche DNA-Sequenzen lassen sich ausgehend von den in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 beschriebenen DNA-Sequenzen oder Teilen dieser Sequenzen, beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Organismen wie oben genannt isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den genannten Sequenzen. Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide beispielsweise der konservierten Bereiche, die über Vergleiche mit anderen Isomerasegenen in dem Fachmann bekannterweise ermittelt werden können, verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure: Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

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

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

Weiterhin sind unter Derivaten Homologe der Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 beispielsweise vorteilhaft prokaryontische Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen.

Außerdem sind unter Homologe der Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Diese Varianten können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne dass aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksame Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

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

Vorteilhaft kann das Isomerase-Gen im erfindungsgemäßen Verfahren mit weiteren Genen der Fettsäurebiosynthese kombiniert werden. Insbesondere die Kombination mit einer Δ -12-Desaturase ist vorteilhaft.

Unter Derivaten der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen sind Proteine zu verstehen, die eine in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine daraus durch Substitution, Inversion, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhaltene Sequenz enthalten, wobei die enzymatische Aktivität der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Proteine erhalten bleibt bzw. nicht wesentlich verändert wird. Diese nicht wesentlich veränderten Proteine sind daher noch enzymatisch aktiv, das heißt funktio-

nell. Unter nicht wesentlich verändert sind alle Enzyme zu verstehen, die noch mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % der enzymatischen Aktivität des Ausgangsenzyms aufweisen. Oder deren enzymatische Aktivität im Vergleich zum Ausgangsenzym bzw. der Ausgangsaminosäuresequenz um mindestens 10 %, bevorzugt um 50 %, besonders bevorzugt um mindestens 100 % gesteigert ist. Dabei können beispielsweise bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität etc.) ersetzt werden. Beispielsweise werden Argininreste gegen Lysinreste, Valinreste gegen Isoleucinreste oder Asparaginsäurereste gegen Glutaminsäurereste ausgetauscht. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge vertauscht, hinzugefügt oder entfernt werden, oder es können mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden.

Unter den im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäurekonstrukten oder -fragmenten sind Sequenzen zu verstehen, die mindestens eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 enthalten oder die sich als Ergebnis des genetischen Codes durch Rückübersetzung aus SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 ableiten lassen oder Derivate der Sequenzen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 enthalten und die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt (= Nukleinsäurekonstrukt) kann aber auch einfacher aufgebaut sein, d.h., es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Sequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Das Isomerase-Gen bzw. die Isomerase-Gene können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacI^q-T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *SP6-*, λ -*P_R*- oder im λ -*P_L*-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden und vorteilhaft für die Vermehrung der Nukleinsäure in diesen Organismen verwendet werden können. Weitere vor-

teilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MF α , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren wie CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, lib4, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin-Promotor enthalten. Weitere vorteilhafte Pflanzenpromotoren sind beispielsweise ein durch Benzensulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO9321334) Promotor. Weitere Pflanzenpromotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel, der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445-245), der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nummer U87999) oder ein Nodien-spezifischen Promotor wie in EP 249676 können vorteilhaft verwandt werden. Vorteilhaft sind insbesondere solche pflanzliche Promotoren, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Fettsäurebiosynthese bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten wie beispielsweise der usp-Promotor, der LEB4-Promotor, der Phaseolin-Promotor oder der Napin-Promotor.

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

Im Nukleinsäurefragment(en) [= Genkonstrukt(en), Nukleinsäurekonstrukt(en)] können neben SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, und/oder SEQ ID NO: 5 wie oben beschrieben noch weitere Gene, die in die Organismen eingebracht werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können unter getrennter Regulation oder unter der gleichen Regulationsregion wie die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Isomerase-Gene liegen. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um weitere Biosynthesegene vorteilhaft der Fettsäurebiosynthese. Vorteilhafte Fettsäurebiosynthesegene sind ausgewählt aus der Gruppe der Nukleinsäuresequenzen, die für eine Acyl-CoA-Dehydrogenase, eine Acyl-ACP [= acyl carrier protein]-Desaturase, eine Acyl-ACP-Thioesterase, eine Fettsäure-Acyl-Transferase, eine Fettsäure-Synthase, eine Fettsäure-Hydroxylase, eine Acetyl-Coenzym A-Carboxylase, eine Acyl-Coenzym A-Oxidase, eine Fettsäure-Desaturase, eine Fettsäure-Acetylenase, eine Lipoxygenase, eine Triacylglycerol-Lipase, eine Allenoxid-Synthase, eine Hydroperoxid-Lyase, einen Fettsäuretransporter oder eine Fettsäure-Elongase codieren. Vorteilhaft werden die Isomerasegene im gleichen Nukleinsäurekonstrukt verwendet wie die weiteren Gene bevorzugt wird als weiteres Gen ein Δ -12-Desaturasegen verwendet.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte werden zur Expression in einem Wirtsorganismus beispielsweise einem Mikroorganismus wie einem Pilz oder einer Pflanze vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, das eine optimale Expression der Gene im Wirt

ermöglicht. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III¹¹³-B1, λ gt11 oder pBdCl, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder 5 pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2□M, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLye23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac⁺, pBIN19, pAK2004, pVKH oder pDH51 oder Derivate der vorstehend genannten Plasmide. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem 10 Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P.H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Geeignete pflanzliche Vektoren werden unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben.

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

20 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, z.B. rekombinante Expressionsvektoren, die mindestens eines im erfindungsgemäßen Verfahren verwendetes Nukleinsäuremolekül enthalten, und Wirtszellen, in die diese Vektoren eingebracht worden sind, insbesondere eukaryontische Mikroorganismen, Pflanzenzellen, Pflanzengewebe, -organe oder ganze Pflanzen. Bei einer Ausführungsform kann eine solche Wirtszelle die hergestellten konjugierten und nicht-konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen speichern; zur Isolation der 25 gewünschten Verbindung werden die Zellen geerntet. Die Verbindung (Öle, Lipide, Triacylglyceride, Fettsäuren) kann dann aus dem Medium oder der Wirtszelle isoliert werden, die die vorgenannten mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthalten oder speichern, am stärksten bevorzugt Zellen sind Zellen von Speichergewebe wie bei Pflanzen 30 Zellen von Samenhüllen, Knollen, Epidermis- und Samenzellen.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine genetisch veränderte Pflanze, bevorzugt ein Ölfruchtpflanze, wie vorstehend erwähnt, besonders bevorzugt eine Lein-, Sonnenblumen-, Baumwoll- oder Safflorpflanze, in die ein Isomerase-Gen eingebracht 35 worden ist. Bei einer Ausführungsform ist das Genom von Lein, Raps, Soja, Sonnenblume, Baumwolle oder Safflor durch Einbringen eines Isomerase-Gens, das für eine Wildtyp- oder mutierte Isomerase-Sequenz codiert, als Transgen verändert worden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird Lein, Sonnenblume, Soja oder Safflor auch zur Produktion einer gewünschten Verbindung, wie Lipiden und Fettsäuren, wobei Triene und/oder Diene besonders bevorzugt sind ganz besonders bevorzugt ist 40 CLA, verwendet.

Der Vektor enthält vorteilhaft mindestens eine Kopie der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenz und/oder des erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukts.

5 Zur Erhöhung der Genkopienzahl können die Nukleinsäuresequenzen oder homologen Gene, beispielsweise in ein Nukleinsäurefragment bzw. in einen Vektor eingebaut werden, der vorzugsweise die den jeweiligen Genen zugeordnete, regulatorische Gensequenzen oder analog wirkende Promotoraktivität enthält. Insbesondere werden solche regulatorische Sequenzen verwendet, die die Genexpression verstärken.

10 Vorteilhafterweise enthalten die Nukleinsäurefragmente zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3' und/oder 5' Terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtsorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

15 Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus (= transgener Organismus) bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

20 Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

25 In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann das Genkonstrukt (= Nukleinsäurekonstrukt; der Singular soll für die vorliegende Beschreibung auch den Plural umfassen) auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurefragment als Vektor oder der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenz bestehen.

30 Vorteilhafterweise wird die Nukleinsäuresequenz (der Singular soll für die vorliegende Beschreibung auch den Plural umfassen) zusammen mit mindestens einem Reporter-Gen in ein Nukleinsäurekonstrukt kloniert, das in das Genom eingebracht wird. Dieses Reporter-Gen sollte eine leichte Detektierbarkeit über einen Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenzassay oder über eine photometrische Messung ermöglichen. Beispielfhaft seien als Reporter-Genen Antibiotika- oder Herbizidresistenzgene, Hydrolasegene, Fluoreszenzproteingene, Biolumineszenzgene, Zucker- oder Nukleotidstoffwechselfgene oder Biosynthesegene wie das Ura3-Gen, das Ilv2-Gen, das Luciferasegen, das β -Galactosidasegen, das gfp-Gen, das 2-Desoxyglucose-6-phosphat-Phosphatasegen, das β -Glucuronidase-Gen, β -Lactamasegen,

das Neomycinphosphotransferasegen, das Hygromycinphosphotransferasegen oder das BASTA (= Gluphosinatresistenz)-Gen genannt. Diese Gene ermöglichen eine leichte Messbarkeit und Quantifizierbarkeit der Transcriptionsaktivität und damit der Expression der Gene. Damit lassen sich Genomstellen identifizieren, die eine unterschiedliche Produktivität zeigen. Weiterhin können erfolgreiche Transformationen vorteilhaft mit diesen Reporter genen identifiziert werden.

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

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

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

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

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch wie oben beschrieben über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer

Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

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

Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Lipid- und Ölbiosynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos. Geeignete Promotoren sind der Napingen-Promotor aus Raps (US 5,608,152), der USP-Promotor aus *Vicia faba* (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67), der Oleosin-Promotor aus *Arabidopsis* (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus *Phaseolus vulgaris* (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus *Brassica* (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promotor (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233-9) sowie Promotoren, welche die samenspezifische Expression in Monokotyledonen-Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der Ipt2- oder Ipt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen (Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen).

Insbesondere kann die multiparallele Expression der im Verfahren verwendeten Isomeren allein oder in Kombination mit Desaturasen wie der Δ -12-Desaturase gewünscht sein. Die Einführung solcher Expressionskassetten kann über eine simultane Transformation mehrerer einzelner Expressionskonstrukte erfolgen oder bevorzugt durch Kombination mehrerer Expressionskassetten auf einem Konstrukt. Auch können mehrere Vektoren mit jeweils mehreren Expressionskassetten transformiert und auf die Wirtszelle übertragen werden.

Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die plastidenspezifische Expression herbeiführen, da Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer sowie einige Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden. Geeignete Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor, sind beschrieben in WO 95/16783 und WO 97/06250, und der clpP-Promotor aus *Arabidopsis*, beschrieben in WO 99/46394.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform können in die erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.

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

Der Wirtsorganismus enthält vorteilhaft mindestens eine Kopie der Nukleinsäuresequenz und/oder des Nukleinsäurekonstrukts.

10 Das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, des Nukleinsäurekonstrukts oder des Vektors in Organismen beispielsweise Pflanzen kann prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

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

20 Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, die Verwendung einer Genkanone, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization*, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225 beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711). Die Transformation von Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* wird beispielsweise von Höfgen und Willmitzer in *Nucl. Acid Res.* (1988) 16, 9877 beschrieben.

35 Mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformierte *Agrobakterien* können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie *Arabidopsis* oder Kulturpflanzen, insbesondere von Öl-haltigen Kulturpflanzen, wie Soja, Erdnuss, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter, Blattstücke, Hypocotylstücke oder Wurzeln in einer
40 *Agrobakterienlösung* gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Unter Verwendung des GATE-WAY-Systems von Invitrogen zur Klonierung sind keine geeigneten Schnittstellen im Vektor mehr notwendig.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten
5 Schriften von S.D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Um eine stabile Integration der Isomerasegene in die transgene Pflanze über mehrere Generation sicherzustellen, sollte jede der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die Isomerase und/oder die vorteilhafte Δ -12-Desaturase codieren, unter der
10 Kontrolle eines eigenen bevorzugt eines unterschiedlichen Promotors exprimiert werden, da sich wiederholende Sequenzmotive zu Instabilität der T-DNA bzw. zu Rekombinationsereignissen früheren können. Die Expressionskassette ist dabei vorteilhaft so aufgebaut, dass einem Promotor eine geeignete Schnittstelle zur Insertion der zu
15 exprimierenden Nukleinsäure folgt vorteilhaft in einem Polylinker anschließend gegebenenfalls ein Terminator hinter dem Polylinker liegt. Diese Abfolge wiederholt sich mehrfach bevorzugt drei-, vier- oder fünfmal, so dass bis zu fünf Gene in einem Kon-
20 strukt zusammengeführt werden und so zur Expression in die transgene Pflanze eingebracht werden können. Vorteilhaft wiederholt sich die Abfolge bis zu zwei- oder dreimal. Die Nukleinsäuresequenzen werden zur Expression über die geeignete
25 Schnittstelle beispielsweise im Polylinker hinter den Promotor inseriert. Vorteilhaft hat jede Nukleinsäuresequenz ihren eigenen Promotor und gegebenenfalls ihren eigenen Terminator. Es ist aber auch möglich mehrere Nukleinsäuresequenzen hinter einem Promotor und ggf. vor einem Terminator zu inserieren. Dabei ist die Insertionsstelle
30 bzw. die Abfolge der inserierten Nukleinsäuren in der Expressionskassette nicht von entscheidender Bedeutung, d.h. eine Nukleinsäuresequenz kann an erster oder letzter Stelle in der Kassette inseriert sein, ohne dass dadurch die Expression wesentlich beeinflusst wird. Es können in der Expressionskassette vorteilhaft unterschiedliche Pro-
35 motoren wie beispielsweise der USP-, LegB4-, DC3- oder der Ubiquitin-Promotor und unterschiedliche Terminatoren verwendet werden. Es ist aber auch möglich nur einen Promotortyp in der Kassette zu verwenden. Dies kann jedoch zu unerwünschten Re-
kombinationsereignissen führen...

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

Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, Nukleinsäurekonstrukte oder Vektoren eignen sich prinzipiell
40 alle eukaryontischen Organismen, wie sie schon genannt wurden, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielfhaft seien Pflanzen wie Arabidopsis, Aste-

raceae wie Calendula, Punicaceae wie Punica granatum oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuss, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersafflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze beispielsweise die Gattung *Mortierella*, *Saprolegnia* oder *Pythium*, Hefen wie die Gattung *Saccharomyces*, Algen oder Protozoen wie Dinoflagellaten wie *Cryptothecodinium* genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersafflor, Rizinus, Flachs, Calendula, Erdnuss, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Sonnenblume, Färbersafflor, Flachs, Calendula oder *Saccharomyces cerevisiae*. Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene Tiere beispielsweise *C. elegans* verwendbar.

Unter transgen im Sinne der Erfindung ist zu verstehen, dass die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren oder Nukleinsäurekonstrukte nicht an ihrer natürlichen Stelle im Genom eines Organismus sind, dabei können die Nukleinsäuren homolog oder heterolog exprimiert werden. Transgen bedeutet aber auch, dass die Nukleinsäuren oder Expressionskassetten an ihrem natürlichen Platz im Genom eines Organismus sind, dass jedoch die Sequenz gegenüber der natürlichen Sequenz verändert wurde und/oder dass die Regulationssequenzen, der natürlichen Sequenzen verändert wurden. Bevorzugt ist unter transgen die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an nicht natürlicher Stelle im Genom zu verstehen, d.h. eine homologe oder bevorzugt heterologe Expression der Nukleinsäuren liegt vor. Bevorzugte transgene Organismen sind die oben genannten transgenen Pflanzen bevorzugt Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Nachtkerze, Hanf, Diestel, Erdnuss, Canola, Lein, Soja, Safflor, Sonnenblume, Borretsch, oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), *Salix*-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfruchtpflanzen, wie Soja, Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Nachtkerze, Sonnenblume, Safflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss).

Die Verwendung der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen oder des Nukleinsäurekonstrukts zur Herstellung von transgenen eukaryontischen Organismen bzw. transgenen Pflanzen gehört deshalb auch zu den Erfindungsgegenständen.

Vorteilhaft wird zur Herstellung von transgenen eukaryontischen Organismen bzw. transgenen Pflanzen eine Nukleinsäuresequenz verwendet ausgewählt aus der Gruppe:

- a) Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5, oder

- b) Nukleinsäuresequenz, die sich durch Rückübersetzung in eine Nukleinsäuresequenz von der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenz aufgrund des degenerierten genetischen Codes ableitet, oder
- 5 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 90 % Identität auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich verändert ist, oder
- 10 d) einer Nukleinsäuresequenz, die sich von dem prokaryontischen codon-usage der Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 11 durch mindestens 0,5 %, vorteilhaft mindestens 1, 2, 3 oder 5 % bevorzugt mindestens 6, 7, 8, 9 oder 10 %, besonders bevorzugt mindestens 20, 30, 40 oder 50 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 60, 70, 80 oder 90 % eines eukaryontischen codon-usage unterscheidet, oder
- 15 e) Derivate der unter (d) beanspruchten Nukleinsäuresequenzen, die um mindestens ein, vorteilhaft mindestens 2, bevorzugt mindestens 3, besonders bevorzugt mindestens 4, ganz besonders bevorzugt mindestens 5 Codontripletts vorteilhaft am 5' Ende der Nukleinsäuresequenzen, die für eine Aminosäure codieren, verlängert ist, ohne dass die enzymatische Wirkung der durch die Nukleinsäuren codierten Polypeptide wesentlich verändert ist.
- 20

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist wie oben beschrieben ein Verfahren zur Herstellung von Fettsäuregemischen mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren dadurch gekennzeichnet, dass man mindestens eine oben beschriebene

25 Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt oder einen Vektor in einen bevorzugt Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und das in dem Organismus enthaltene Öl und/oder Triglycerid isoliert und die im Öl und/oder Triglycerid enthaltenden Fettsäuren freisetzt.

Auch ein Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an konjugierten und/oder nicht-konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen, dadurch gekennzeichnet, dass man mindestens eine oben beschriebene Nukleinsäuresequenz oder mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt oder einen Vektor in einen Öl produzierenden Organismus bringt, diesen Organismus anzieht und dass in dem Organismus enthaltene Öl

30 isoliert, gehört zu den Erfindungsgegenständen.

35

Beide Verfahren ermöglichen vorteilhaft die Synthese von Fettsäuregemischen oder Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an konjugierten und/oder nicht-konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft drei Doppelbindungen. Da diese speziell in Pflanzen natürlicherweise nicht vorkommt, sind die aus den

Pflanzen resultierenden Öle, Lipide und/oder Fettsäuregemische neu. Gleiches gilt auch für andere eukaryontische Organismen.

Als Organismen für die genannten Verfahren seien beispielhaft Pflanzen wie Arabidopsis, Soja, Erdnuss, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbervavil (Carthamus tinctorius) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze Mortierella, Saprolegnia oder Pythium, Hefen wie die Gattung Saccharomyces, Algen oder Protozoen wie Dinoflagellaten wie Cryptocodinium genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze wie Mortierella alpina, Pythium insidiosum oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbervavil, Rizinus, Calendula, Punica, Erdnuss, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie Saccharomyces cerevisiae, besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Sonnenblume, Calendula, Punica oder Saccharomyces cerevisiae.

Die in den Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0 und 100°C, bevorzugt zwischen 10 bis 60°C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, d.h. während der Anzucht reguliert werden oder nicht. Die Anzucht kann batch weise, semi batch weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nach gefüttert werden.

Pflanzen werden nach Transformation zunächst wie oben beschrieben regeneriert und anschließend wie üblich angezüchtet bzw. angebaut.

Aus den Organismen werden nach Anzucht die Lipide in üblicherweise gewonnen. Hierzu können die Organismen nach Ernte zunächst aufgeschlossen werden oder direkt verwendet werden. Die Lipide werden vorteilhaft mit geeigneten Lösungsmitteln wie apolare Lösungsmittel wie Hexan oder Ethanol, Isopropanol oder Gemischen wie Hexan/Isopropanol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol bei Temperaturen zwischen 0 bis 80°C, bevorzugt zwischen 20 bis 50°C extrahiert. Die Biomasse wird in der Regel mit einem Überschuss an Lösungsmittel extrahiert beispielsweise einem Überschuss von Lösungsmittel zu Biomasse von 1:4. Das Lösungsmittel wird anschließend beispielsweise über eine Destillation entfernt. Die Extraktion kann auch mit superkritischem CO₂ erfolgen. Nach Extraktion kann die restliche Biomasse beispielsweise über Filtration entfernt werden.

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

Zur Gewinnung der freien Fettsäuren aus den Triglyceriden werden diese in üblicher-
weise verseift.

Die Erfindung wird im Folgenden an Beispielen erläutert:

Beispiele

- 5 Beispiel 1: Klonierung und Expression der CLA-Isomerase aus *Propionibacterium acnes* in Bakterien

Die cDNA der CLA-Isomerase aus *Propionibacterium acnes*, welche Linolsäure in das
t10,c12-CLA-Isomer umsetzt, war bekannt von WO 01/00846 und wurde unter -
Verwendung von folgenden Primern über eine PCR mit Pfu-Polymerase (Roche -
10 Diagnostics) amplifiziert und in den pSE380 Vektor (Invitrogen) kloniert:

Primer A: 5' - ATC TGC AGA TGT CCA TCT CGA AGG AT - 3'
Forward Primer (mit PstI Schnittstelle)

Primer B: 5' - GCG AGC TCA CAC GAA GAA CCG CGT C - 3'
Reverse Primer (mit SacI Schnittstelle)

- 15 Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

| | | |
|--|--|---------|
| | dNTP-Mix (10 mM) | 1,0 µl |
| | Forward Primer (10 µM) | 2,0 µl |
| | Reverse Primer (10 µM) | 2,0 µl |
| | Template (1/100 verdünnte genomische DNA 20 von <i>Propionibacterium acnes</i>)* | 1,0 µl |
| | 10-Fach Puffer | 5,0 µl |
| | Polymerase (3,5 U /µl) | 0,5 µl |
| | Wasser | 38,5 µl |
| | Gesamtvolumen | 50,0 µl |

- 25 * Es wurde genomische DNA von *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 von der
Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braun-
schweig) verwendet.

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

| | | | |
|----|----|----------------|------|
| | 1. | 2 min | 94°C |
| 30 | 2. | 30 sec | 94°C |
| | 3. | 1 min | 62°C |
| | 4. | 2 min | 72°C |
| | 5. | 35 x 2. bis 4. | |
| | 6. | 5 min | 72°C |

42

Das amplifizierte DNA-Fragment wurde aus einem präparativen Agarosegel geschnitten und mit dem QiaQuick Gel Elution Kit (Qiagen) eluiert. Sowohl das PCR-Fragment als auch der pSE380 wurden mit PstI und SacI geschnitten und der offene Vektor wurde zusätzlich mit einer alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Beide DNA-Fragmente wurden mit der T4-Ligase zueinander ligiert. Das so hergestellte pSE-PAI-Konstrukt wurde in *E. coli* amplifiziert und zur Kontrolle doppelsträngig sequenziert.

Beispiel 2: Expression einer codon-optimierten CLA-Isomerase aus *Propionibacterium acnes* in Hefe

In einem ersten Ansatz wurde der N-Terminus der Isomerase so verändert, dass die ersten 60 Basenpaare der codierenden Sequenz der optimalen Codonzusammensetzung der Hefe entsprechen. Anschließend wurde die modifizierte cDNA in einen Hefeexpressionsvektor kloniert und die Funktionalität der modifizierte Isomerase in Hefe überprüft.

Ein Forward Primer mit codon-optimierter Sequenz wurde verwendet, um mittels PCR eine codon-optimierte *Propionibacterium* Isomerase zu generieren. Die PCR erfolgte mit dem Expand High Fidelity-PCR-System (Roche Diagnostics) unter Verwendung von folgenden Primern:

Primer C: 5' - GAA TTC CAC CAT GGG TTC CAT TTC CAA GGA CTC CAG AAT
TGC TAT TAT TGG TGC TGG CCC GGC CGG GCT GGC - 3'

Forward Primer (mit EcoRI Schnittstelle)

Primer D: 5' - GCG GCC GCT CAC ACG AAG AAC CGC GTC ACC AG - 3'

Reverse Primer (mit NotI Schnittstelle)

Durch die Verwendung der Primer wird die folgende Originalsequenz:

atg --- tcc atc tcg aag gat tca cgt atc gcc atc atc ggg gct ggc ccg gcc ggg ctg gc

zur folgenden modifizierten Sequenz verändert:

atg **ggg tcc att tcc** aag **gac tcc aga att gct att att ggt** gct ggc ccg gcc ggg ctg gc

SEQ ID NO: 1 gibt die optimierte, modifizierte Gesamtsequenz der *Propionibacterium acnes* Nukleinsäuresequenz wieder. SEQ ID NO: 7 ist die Originalsequenz zu entnehmen.

Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

dNTP-Mix (10 mM)

1,0 µl

43

| | | |
|---|---|--------------|
| | Forward Primer (10 μ M) | 4,0 μ l |
| | Reverse Primer (10 μ M) | 4,0 μ l |
| | Template (1/50 verdünnte pSE-PAI Plasmid-DNA) | 1,0 μ l |
| 5 | 10-Fach Puffer | 5,0 μ l |
| | Polymerase (3,5 U / μ l) | 0,5 μ l |
| | Wasser | 34,5 μ l |
| | Gesamtvolumen | 50,0 μ l |

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

| | | | |
|----|----|----------------|--------------------------------------|
| 10 | 1. | 2 min | 94°C |
| | 2. | 30 sec | 94°C |
| | 3. | 30 sec | 51°C |
| | 4. | 2 min | 72°C |
| | 5. | 10 x 2. bis 4. | |
| 15 | 6. | 30 sec | 94°C |
| | 7. | 30 sec | 51°C |
| | 8. | 2 min | 72°C, Zeitincrement 5 sec pro Zyklus |
| | 5. | 15 x 6. bis 8. | |
| | 6. | 5 min | 72°C |

- 20 Das amplifizierte DNA-Fragment wurde aus einem präparativen Agarosegel geschnitten, mit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience) eluiert und in den pGEM-T-Vector (Promega) nach Herstellerangaben kloniert. Nach einer Amplifikation der Plasmid-DNA in *E. coli*, wurde die codon-optimierte Isomerase-cDNA über die EcoRI und NotI Schnittstellen in den gleichfalls geschnittenen Vektor pYES2
- 25 ligiert. Das so hergestellte pY2-coPAI-Konstrukt wurde in *E. coli* amplifiziert und zur Hefe-Expression in den Hefestamm INVSc1 (Invitrogen) mit der LiAc-Methode - (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1995) transformiert.

a) Expression in Hefezellen

- 30 Sämtliche Fest- und Flüssigmedien für Hefe wurden nach Protokolle von Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1995) hergestellt.

- Die Expression von coPAI in *S. cerevisiae* INVSc1 erfolgte modifiziert nach Avery et al. (Appl. Environ. Microbiol., 62, 1996: 3960-3966) und Girke et al. (The Plant Journal, 5, 1998: 39-48). Um eine Starterkultur herzustellen, wurden 20 ml SD-Medium mit Glucose und Aminosäure-/Baselösung ohne Uracil für die Selektion mit einer Hefe-Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C und 140 rpm inkubiert. Die Zellkultur wurde zweimal gewaschen durch Abzentrifugieren und Resuspendieren in SD-Medium ohne Supplemente und ohne Zucker. Mit den gewaschenen Zellen wurde eine Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,3 angeimpft. Die Anzucht der Hauptkultur erfolgte
- 40

in 25 ml SD-Medium mit 2 % (w/v) Galaktose, Aminosäure-/Baselösung ohne Uracil für die Selektion, 0,02 % Linolsäure (2%ige Stammlösung in 5 % Tergitol NP40), 10 % Tergitol NP40 72 Stunden lang bei 30°C. Die Ernte der Hauptkultur erfolgte über Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde bei -20°C eingefroren und anschließend für mindestens 18 Stunden lyophilisiert.

b) Lipidextraktion der Fettsäuren aus transgener Hefe

Die lyophilisierten Hefepellets wurden in 1,35 ml Methanol/Toluol (2:1) und 0,5 ml Natrium-Methoxid-Lösung extrahiert. Das Zellmaterial wurde mit einem Glasstab möglichst fein zermörsert und dann 1 h lang bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 1,8 ml 1 M NaCl-Lösung und 3 ml n-Heptan zugegeben und 10 min lang bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 4°C) wurde der Heptan-Überstand in ein Reagenzglas überführt und unter Stickstoff eingedampft. Der Rückstand wurde in 3 mal 0,3 ml Hexan aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und wiederum unter Stickstoff eingedampft. Der Rückstand wurde in 50 µl Acetonitril aufgenommen und die Probe per GC bzw. GC/MS analysiert.

c) Extraktion der freien Fettsäuren aus transgene Hefe

Die Isomerase aus *P. acnes* nimmt freie Linolsäure als Substrat. Um nachzuweisen, ob nach Expression der coPAI in Hefezellen das t10,c12-CLA-Isomer im Pool der freien Fettsäuren vorkommt, wurden die freien Fettsäuren mit der HIP-Methode extrahiert, mit Methanol methyliert und anschließend mittels GC oder GC/MS nachgewiesen.

Für die HIP-Extraktion wurde das Hefepellet in 15 ml HIP-Puffer (Hexan/Isopropanol 3:2 (v/v) mit 0,0025 % BHT (2,6-Di-tert.-butyl-4-methyl-phenol)) aufgenommen und mit einem Glasstab möglichst fein homogenisiert. Nach Zugabe von 75 µl 1 M HCl wurde das Gemisch für 5 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach einer Phasentrennung durch Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, aufgefüllt auf 22,5 ml mit einer K₂SO₄-Lösung (66,6 g K₂SO₄/l H₂O) und wiederum für 5 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach einer erneuten Phasentrennung durch Zentrifugation (5 min, 4000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reagenzglas überführt und unter Stickstoff eingedampft. Der Rückstand wurde mit 2 mal 1 ml Hexan in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und wiederum unter Stickstoff eingedampft. Letztendlich wurde der Rückstand in 400 µl Methanol aufgenommen.

Zur Methylierung der extrahierten freien Fettsäuren wurde die extrahierte Probe in 400 µl Methanol mit 10 µl EDAC-Lösung (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, 1 mg in 10 ml Methanol) versetzt und 2 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl 0,1 M Tris/HCl-Lösung, pH 7,5, als auch 1 ml Hexan wurde das Gemisch gründlich vermischt durch Vortexen und zentrifugiert (5 min, 12000 rpm, RT). Nach der Phasentrennung wurde die obere Phase in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Das Gemisch wurde nochmals mit 1 ml Hexan extrahiert,

beide Hexanphasen vereinigt und unter Stickstoff eingedampft. Der Rückstand wurde in 40 µl Acetonitril aufgenommen.

d) GC-Analyse

Zur GC-Analyse der Fettsäure-Methylester (FAME) wurden 7 µl der Probe (in Acetonitril) in ein Probenröhrchen überführt und 1 µl injiziert. Die GC-Analyse erfolgte über eine HP-DB23 (Cross-linked PEG; 30 m x 0,32 mm x 0,5 µm Beschichtungsdicke) bei einer Flussrate von 1,5 ml/min. Als Trägergas diente Helium. Die Injektionstemperatur betrug 220°C. Folgender Temperaturgradient wurde angelegt: 1 min 150°C, 150°C bis 200°C (mit 15°C/min), 200°C bis 250°C (mit 2°C/min), 5 min 250°C. Die Detektion der FAME erfolgte über einen Flammen-Ionisations-Detektor (FID) bei 275°C. Die Retentionszeiten betragen für konjugierte Linolsäure 10c,12-CLA 14,3 min. Die Retentionszeiten für Linolsäure betrug 12,68 min und für Ölsäure 11,86 min.

Resultate

In Fig. 1 ist die Produktion von t10,c12-CLA in Hefezellen dargestellt (Hefeexpression PAI - transmethyliert), die mit der codon-optimierten CLA-Isomerase aus *Propionibacterium acnes* (= PAI-Isomerase oder kurz PAI) transformiert wurden. Fig. 1A zeigt das Gas-Chromatogramm der Lipidextrakte aus Hefezellen, die mit dem Leervektor pYES2 transformiert wurden. Die Zellen wurden 72 h lang bei 30°C mit 0,02 % Linolsäure angezogen. Das Gas-Chromatogramm weist keine FAME mit einer Retentionszeit von t10,c12-CLA auf. In Fig. 1B ist das Gas-Chromatogramm der Lipidextrakte aus Hefezellen transformiert mit pY2-coPAI dargestellt. Die Zellen wurden wiederum 72 h lang bei 30°C mit 0,02 % Linolsäure angezogen. Das Gas-Chromatogramm weist einen deutlichen Peak mit einer Retentionszeit von 14,37 min auf, der im Kontrollansatz nicht auftritt (vgl. Fig. 1A) und die gleiche Retentionszeit wie t10,c12-CLA aufweist (vgl. Fig. 1C). Die Expression erfolgte im Stamm INVSc1, der 3 Tage bei 30°C auf Linolsäure angezogen wurde, anschließend erfolgte eine Transmethylierung der Fettsäuren.

In Fig. 2 wird das Vorkommen des t10,c12-CLA-Isomer in dem Pool der freien Fettsäuren dargestellt. Fig. 2A zeigt das Gas-Chromatogramm der methylierten Fettsäuren aus Hefezellen, die mit dem Leervektor pYES2 transformiert wurden. Die Zellen wurden 72 h lang bei 30°C mit 0,02 % Linolsäure angezogen. Das Gas-Chromatogramm weist keine FAME mit einer Retentionszeit von t10,c12-CLA auf. In Fig. 2B ist das Gas-Chromatogramm der methylierte Fettsäuren aus Hefezellen transformiert mit pY2-coPAI dargestellt. Die Zellen wurden wiederum 72 h lang bei 30°C mit 0,02 % Linolsäure angezogen. Das Gas-Chromatogramm weist einen deutlichen Peak mit einer Retentionszeit von 14,29 min auf, der im Kontrollansatz nicht auftritt (vgl. Fig. 2A) und die gleiche Retentionszeit wie das t10,c12-CLA-Isomer aufweist (vgl. Fig. 2C). Die Expression erfolgte im Stamm INVSc1, der 3 Tage bei 30°C auf Linolsäure angezogen wurde, anschließend erfolgte eine Methylierung der Fettsäuren.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der GC-Analysen dargestellt. Die Leerkontrolle zeigt die Fettsäurezusammensetzung von transgenen Hefezellen, die mit dem leeren pYES

Vektor transformiert wurden. PAI 4.3.1, PAI 4.3.2, PAI 6.1.1 und PAI 6.1.2 entsprechen unabhängigen Wiederholungen der coPAI-Expression in transgenen Hefezellen. Experiment A stellt die FAME-Analysen der Lipide nach Inkubation für 72 h bei 30°C mit 0,02 % Linolsäure dar. Experiment B stellt die FAME-Analysen der freien Fettsäuren nach Inkubation für 72 h bei 30°C mit 0,02 % Linolsäure dar. Experiment C stellt die FAME-Analysen der Lipide nach Inkubation für 10 Tage bei 16°C mit 0,02 % Linolsäure dar.

Die in Fig. 1, Fig. 2 und Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die codon-optimierte Isomerase aus *P. acnes* in Hefe zur Bildung von t10,c12-CLA durch Umsetzung von Linolsäure führt. Der Nachweis von t10,c12-CLA aus transformierten Hefezellen gelang nach Hydrolyse der Lipide. Da Hefe kaum Triacylglyceride enthält, muss man davon ausgehen, dass der Großteil der so nachgewiesenen t10,c12-CLA in den Phospholipiden der Hefe gebunden war. Der Nachweis von t10,c12-CLA aus transformierten Hefezellen gelang auch nach Extraktion und Methylierung der freien Fettsäuren. Das deutet darauf hin, dass die coPAI in transgene Hefezellen auch die freien Fettsäuren als präferentielles Substrat benutzen.

Beispiel 3: Expression der Isomerase aus *Propionibacterium acnes* in Hefe

Um die Funktionalität der *Propionibacterium acnes* Isomerase (PAI) cDNA aus der WO 01/00846 Anmeldung in einem eukaryontischen Organismus nachzuweisen, wurde in einem ersten Ansatz der codierende Bereich der cDNA von PAI in einen Hefe-expressionvektor kloniert und in *S. cerevisiae* exprimiert. Die in der Hefe produzierte Isomerase sollte zugesetzte Linolsäure in das t10,c12-CLA-Isomer umsetzen. Dies wiederum sollte in transmethylierten Lipidextrakten als auch in methylierten Hefeextrakten über GC und GC/MS als Methylester nachgewiesen werden.

Die PAI-cDNA wurde über eine PCR mit dem Expand High Fidelity-PCR-System (Roche Diagnostics) unter Verwendung von folgenden Primern amplifiziert und in den pYES2 Vektor kloniert:

Primer C: 5' - CAG ACA TAT GTC CAT CTC GAA GGA TTC - 3'
Forward Primer (mit NdeI Schnittstelle)

Primer D: 5' - CTA TCT CGA GTC ACA CGA AGA ACC GCG TC - 3'
Reverse Primer (mit XhoI Schnittstelle)

Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

| | |
|---|--------|
| dNTP-Mix (10 mM) | 1,0 µl |
| Forward Primer (10 µM) | 4,0 µl |
| Reverse Primer (10 µM) | 4,0 µl |
| Template (1/50 verdünnte pSE-PAI Plasmid-DNA) | 1,0 µl |
| 10-Fach Puffer | 5,0 µl |

| | |
|------------------------------|--------------|
| Polymerase (3,5 U / μ l) | 0,5 μ l |
| Wasser | 34,5 μ l |
| Gesamtvolumen | 50,0 μ l |

Es wurde folgende PCR-Programm verwendet:

| | | | | |
|----|-----|----------------|--------------------------------------|--|
| 5 | 1. | 2 min | 94°C | |
| | 2. | 30 sec | 94°C | |
| | 3. | 30 sec | 51°C | |
| | 4. | 2 min | 72°C | |
| | 5. | 10 x 2. bis 4. | | |
| 10 | 6. | 30 sec | 94°C | |
| | 7. | 30 sec | 51°C | |
| | 8. | 2 min | 72°C, Zeitincrement 5 sec pro Zyklus | |
| | 9. | 15 x 6. bis 8. | | |
| | 10. | 5 min | 72°C | |

- 15 Das amplifizierte DNA-Fragment wurde aus einem präparativen Agarosegel geschnitten, mit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience) eluiert und in den pGEM-T-Vector (Promega) nach Herstellerangaben kloniert. Nach einer Amplifikation der Plasmid-DNA in *E. coli*, wurde die Isomerase-cDNA über die NdeI und XhoI Schnittstellen herausgeschnitten und die cDNA-Enden mit der T4-
- 20 Polymerase geglättet. Der pYES2 Vektor wurde mit EcoRI geöffnet, die cDNA-Enden mit der T4-Polymerase geglättet und mit einer alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Beide DNA-Fragmente wurden mit der T4-Ligase zueinander legiert und die Insertionsrichtung durch einen BamHI-Verdau überprüft. Das so hergestellte pY2-PAI-Konstrukt wurde in *E. coli* amplifiziert und zur Hefe-Expression in den Hefestamm
- 25 INVSc1 (Invitrogen) mit der LiAc-Methode (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1995) transformiert.

a) Expression in Hefezellen

- 30 Die Expression von PAI in *S. cerevisiae* INVSc1 erfolgte, wie oben beschrieben, modifiziert nach Avery et al. (Appl. Environ. Microbiol., 62, 1996: 3960-3966) und Girke et al. (The Plant Journal, 5, 1998: 39-48).

b) Lipidextraktion der Fettsäuren aus transgener Hefe

Die lyophilisierten Pellets von transgenen pY2-PAI-Hefezellen wurden wie in Beispiel 2 beschrieben extrahiert.

c) Extraktion der freien Fettsäuren aus transgener Hefe

- 35 Die freien Fettsäuren aus transgenen pY2-PAI-Hefezellen wurden wie in Beispiel 2 beschrieben mit der HIP-Methode extrahiert, methyliert und anschließend mittels GC oder GC/MS nachgewiesen.

d) GC-Analyse

Die GC-Analyse wurde wie oben in Beispiel 2 beschrieben durchgeführt.

Resultate

In Beispiel 2 wurde gezeigt, dass die codon-optimierte Isomerase aus *Propionibacterium acnes* (coPAI), wenn in Hefezellen exprimiert, die zugeführte Linolsäure in das t10,c12-CLA-Isomer umsetzen kann. In analogen Experimenten mit der PAI aus WO 01/00846 konnte ebenfalls eine Umsetzung von Linolsäure in das t10,c12-CLA-Isomer in transgenen Hefezellen gezeigt werden, wenn auch in weit vermindertem Maße. Wir zeigen also, dass durch eine Codon Optimierung die Expression eines aktiven Isomerase Proteins, welches Linolsäure in t10,c12 CLA umsetzen kann, in einer eukaryontischen Zellen wie *S. cerevisiae* deutlich gesteigert werden kann.

In Fig. 4 ist die Produktion von t10,c12-CLA in Hefezellen dargestellt (Hefeexpression PAI - transmethylert), die mit der bakteriellen CLA-Isomerase aus *Propionibacterium acnes* (= PAI-Isomerase oder kurz bakt.PAI) transformiert wurden. Fig. 4A zeigt das Gas-Chromatogramm der Lipidextrakte aus Hefezellen, die mit dem Leervektor pYES2 transformiert wurden. Die Zellen wurden 72 h lang bei 30°C mit 0,02 % Linolsäure angezogen. Das Gas-Chromatogramm weist keine FAME mit einer Retentionszeit von t10,c12-CLA auf. In Fig. 4B ist das Gas-Chromatogramm der Lipidextrakte aus Hefezellen transformiert mit pY2-bakt.PAI dargestellt. Die Zellen wurden wiederum 72 h lang bei 30°C mit 0,02 % Linolsäure angezogen. Das Gas-Chromatogramm weist einen sehr kleinen Peak mit einer Retentionszeit von 14,37 min auf, der im Kontrollansatz nicht auftritt (vgl. Fig. 4A). Als Vergleich ist in Fig. 4C das Gas-Chromatogramm der Lipidextrakte aus Hefezellen, die mit pY2-PAI transformiert wurden und unter gleichen Bedingungen wie in 4A und b kultiviert wurden, dargestellt. Das Chromatogramm zeigt wie in Fig. 1B einen deutlichen Peak mit einer Retentionszeit von 14,37 min auf, der Retentionszeit von t10,c12-CLA (siehe Fig. 1C) . Die Expression erfolgte im Stamm INVSc1, der 3 Tage bei 30°C auf Linolsäure angezogen wurde, anschließend erfolgte eine Transmethylierung der Fettsäuren.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der GC-Analysen dargestellt. Die Leerkontrolle zeigt die Fettsäurezusammensetzung von transgenen Hefezellen, die mit dem leeren pYES Vektor transformiert wurden. PAI 4.3.1, PAI 4.3.2, PAI 6.1.1 und PAI 6.1.2 entsprechen unabhängigen Wiederholungen der coPAI-Expression in transgenen Hefezellen. Bakt.PAI 4.1, 4.2, 9.1, 9.2 entsprechen unabhängigen Wiederholungen der bakt.PAI-Expression in transgenen Hefezellen. Experiment E stellt die FAME-Analysen der Lipide nach Inkubation für 72 h bei 30°C mit 0,02 % Linolsäure dar. Experiment F stellt die FAME-Analysen der freien Fettsäuren nach Inkubation für 72 h bei 30°C mit 0,02 % Linolsäure dar.

Beispiel 4: Inkubation aufgeschlossener transgener Hefezellen mit Linolsäure

Neben der funktionalen Expression der PAI und coPAI in transgenen Hefezellen wurde auch die Umsetzung von Linolsäure in das t10,c12-CLA-Isomer in vitro untersucht.

- 5 Dazu wurden beide Klone in Hefezellen transformiert, und nach einer Hauptkultur wurden die Hefezellen mechanisch aufgeschlossen und mit freier Linolsäure inkubiert. Die Aktivität beider Isomerasen wurde über GC bzw. GC/MS bestimmt.

- Eine Hauptkultur mit transgenen Hefen die entweder das pY2-PAI oder pY2-coPAI Konstrukt tragen wurde wie oben beschrieben angezogen. Nach einer Bestimmung der OD600 wurde die Hauptkultur durch Zentrifugation (7 min, 3800 rpm, 4°C) in sterilen Zentrifugenröhrchen geerntet. Die Zellpellets wurden mit 5 ml sterilem H₂O gewaschen und erneut geerntet (7 min, 3800 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde mit 5 ml 0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0, gewaschen und erneut geerntet durch Zentrifugation (7 min, 3800 rpm, 4°C). Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen und die Hefepellets für mindesten 2 h bei -80°C schockgefroren. Anschließend wurden die Pellets in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0 aufgenommen, so dass ein OD600 von 30 entsteht. Es wurden 3 große Glaskugeln (Durchmesser 0,4 cm) und 1,3 g kleinen Glaskugeln (Durchmesser 0,25 bis 0,5 mm) pro Zentrifugenröhrchen dazugegeben. Das Zellmaterial wurde 1 min bei maximaler Schüttelfrequenz gevortext und anschließend für 1 min im Eisbad inkubiert. Dieser Vorgang wurde 6 mal wiederholt. Nach der letzten Wiederholung wurde das Zellmaterial abzentrifugiert (7 min, 3800 rpm, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Überstand wurde nochmals abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Letztendlich wurden 900 ml Zelllysate mit 250 ng Linolsäure für 30 min bei RT (= ca. 23 °C) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Fettsäuren nach Bligh und Dyer (Can. J. Biochem. Physiol., 37, 1959: 911-917) extrahiert; es wurden 100 ml Eisessig sowie 1,5 ml 0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0, 2,5 ml Methanol und 2,5 ml Chloroform dazugegeben und das Gemisch für 1 min geschüttelt. Nach einer Phasentrennung durch Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, RT) wurde die untere Phase in ein neues Reagenzglas überführt und unter Stickstoff eingedampft. Der Rückstand wurde mit 2 mal 500 ml Chloroform in ein Reaktionsgefäß überführt und wiederum unter Stickstoff eingedampft. Der Rückstand wurde letztendlich in 100 µl Methanol gelöst.

- 35 Die restliche Probe von 90 µl wurde wie oben beschrieben methyliert und per GC gemessen.

Tabelle 1: Ergebnisse der GC-Analysen

| Zusammenstellung der Experimente PAI in Hefe | | | | | | |
|---|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|---------------------|------------------|
| A | | | | | | |
| Klon | 16:0 [%] | 16:1-(9Z) [%] | 18:0 [%] | 18:1-(9Z) [%] | 18:2 LA* [%] | CLA** [%] |
| Leerkontrolle | 17,3 | 9,5 | 6,1 | 6,7 | 60,5 | - |
| PAI 4.3.1 | 19,3 | 8 | 6,6 | 5,3 | 56,4 | 4,4 |
| PAI 4.3.2 | 19 | 8,5 | 5,9 | 4,9 | 56,6 | 5,1 |
| PAI 6.1.1. | 19 | 9,6 | 6 | 5,6 | 55 | 4,7 |
| PAI 6.1.2. | 18,8 | 9,2 | 5,7 | 5,3 | 56 | 4,9 |
| B | | | | | | |
| Leerkontrolle | 39 | - | 48,2 | - | 12,8 | - |
| PAI 4.3.1 | 41,9 | - | 52,4 | - | 3,7 | 2 |
| PAI 4.3.2 | 37,8 | - | 48 | - | 9,5 | 4,7 |
| PAI 6.1.1. | 35,6 | - | 42,9 | - | 15,2 | 6,3 |
| PAI 6.1.2. | 36,7 | - | 44,3 | - | 12,6 | 6,4 |
| C | | | | | | |
| Leerkontrolle | 14 | 27,4 | 4 | 14,6 | 40 | - |
| PAI 4.3.1 | 18,6 | 22,8 | 5,4 | 12,4 | 37,4 | 3,3 |
| PAI 4.3.2 | 18,8 | 23 | 5,8 | 12,9 | 36,3 | 3,3 |
| PAI 6.1.1. | 18,7 | 24,5 | 5,7 | 13,3 | 34,5 | 3,3 |
| PAI 6.1.2. | 19 | 24,1 | 5,8 | 13,6 | 34,1 | 3,4 |
| D | | | | | | |
| Leerkontrolle | 2,8 | - | 4,8 | - | 92,4 | - |
| PAI 4.3.1 | 7,3 | - | 11,7 | - | 76,7 | 4,3 |
| PAI 4.3.2 | 5,2 | - | 9,5 | - | 79,7 | 5,6 |
| PAI 6.1.1. | 5,3 | - | 8,8 | - | 71,2 | 14,8 |
| PAI 6.1.2. | 3,8 | - | 5,9 | - | 74,2 | 16,1 |
| Reproduktionsexperiment: E | | | | | | |
| Leerkontrolle | 3,6 | - | 6,5 | - | 89,9 | - |
| PAI 4.3.1 | 7,7 | - | 13,5 | - | 71 | 7,8 |
| PAI 4.3.2 | 5,3 | - | 8,8 | - | 68,4 | 17,4 |
| PAI 6.1.1. | 3,4 | - | 5,8 | - | 76 | 14,8 |
| PAI 6.1.2. | 11,4 | - | 18,5 | - | 60,4 | 9,8 |
| * Zugesezte Linolsäure | | | | | | |
| ** CLA: 18:2-(10E,12Z) | | | | | | |

| Legende zu Tabelle 1 | | |
|----------------------|---|-------------------|
| | Art des Experiments | Aufarbeitung: |
| A | 3 Tage bei 30°C auf Linolsäure kultiviert | Transmethylierung |
| B | 3 Tage bei 30°C auf Linolsäure kultiviert | Methylierung |
| C | 10 Tage bei 16°C auf Linolsäure kultiviert | Transmethylierung |
| D | 3 Tage bei 30°C kultiviert mechanisch aufgeschlossen Lysat mit Linolsäure inkubiert | Methylierung |

Resultate

Die Resultate der *in vitro* Umsetzung von Linolsäure in das t10,c12-CLA-Isomer durch PAI und coPAI verhielten sich analog zu den Ergebnissen aus Beispiel 2. In Fig. 3 ist zu sehen, dass aufgeschlossene Hefezellen welche die codon-optimierte PAI exprimieren in der Lage sind zugefütterte Linolsäure in t10,c12-CLA umzusetzen. Fig. 3A zeigt das Gas-Chromatogramm der methylierten Fettsäuren aus Hefezelllysaten die mit dem leeren pYES2-Vektor transformiert wurden. Die Zellysate wurden 30 min lang bei RT mit 200 ng Linolsäure inkubiert. Das Gas-Chromatogramm weist keine FAME mit einer Retentionszeit von t10,c12-CLA auf. In Fig. 3B ist das Gas-Chromatogramm der methylierte Fettsäuren aus Hefezelllysaten transformiert mit pY2-coPAI dargestellt. Die Zellysate wurden wiederum 30 min lang bei RT mit 200 ng Linolsäure inkubiert. Das Gas-Chromatogramm weist einen deutlichen Peak mit einer Retentionszeit von 14,34 min auf, der im Kontrollansatz nicht auftritt (vgl. Fig. 3A) und die gleiche Retentionszeit wie das t10,c12-CLA-Isomer aufweist (vgl. Fig. 3C). Die Expression erfolgte im Stamm INVSc1, der 3 Tage bei 30°C angezogen wurde, anschließend erfolgte ein mechanischer Aufschluss und eine Inkubation in Gegenwart von Linolsäure mit anschließender Methylierung der Fettsäuren.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der GC-Analysen dargestellt. Die Leerkontrolle zeigt die Fettsäurezusammensetzung von transgenen Hefezellen, die mit dem leeren pYES Vektor transformiert wurden. PAI 4.3.1, PAI 4.3.2, PAI 6.1.1 und PAI 6.1.2 entsprechen unabhängigen Wiederholungen der coPAI-Expression in transgenen Hefezellen. Experiment D zeigt die Ergebnisse der FAME-Analysen von methylierten freien Fettsäuren nach Inkubation von Hefezelllysaten für 30 min bei RT mit 200 ng Linolsäure. Experiment E ist eine unabhängige Wiederholung von Experiment D.

Die in Fig. 3 und Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Umsetzung von Linolsäure in das t10,c12-CLA-Isomer durch die codon-optimierte Isomerase aus *Propionibacterium acnes* auch *in vitro* möglich ist.

Beispiel 5: Expression in E. coli BL21(DE3)pLysS-Zellen

a) Zellanzucht

Das entsprechend dem Beispiel 3 isolierte PAI-tragende DNA-Fragment wurde in den Vektor pET24a (Novagen) mit Hilfe der T4-Ligase (MBI-Fermentas) cloniert und anschließend zunächst in E. coli XL1-Blue-Zellen transformiert. Aus diesen wurden nach Bestätigung einer erfolgreichen Clonierung das entstandene Plasmid pET24a-PAI (0,2 µg) zur Transformation von E.coli BL21(DE3)pLysS-Zellen verwendet.

Eine Einzelkolonie der entstandenen mit pET24a-PAI transformierten E.coli BL21(DE3)pLysS-Zellen wurde zum Animpfen von 3 ml LB-Medium-Vorkultur verwendet, die als Zusatz die Antibiotika Kanamycin und Chloramphenicol zur Selektion enthielt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C, 200 rpm angezogen. Anschließend wurde eine Hauptkultur mit 25 ml LB-Medium, der Kanamycin und Chloramphenicol zur Selektion zugesetzt wurde, mit 250 µl dieser Vorkultur angeimpft und bei 37°C, 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 angezogen. Je zweimal 5 ml dieser Kultur wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt, abzentrifugiert (3800 rpm, 15 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet bei –80°C eingefroren.

Die restliche Hauptkultur wurde mit 10 µl 1M IPTG induziert und weitere 3 h schüttelnd bei 37°C inkubiert und anschließend in Zentrifugenröhrchen überführt, abzentrifugiert (3800 rpm, 15 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet bei –80°C eingefroren.

b) Umsetzung von Fettsäuren

Für die Umsetzung verschiedener Fettsäuren wurden die Zellen aufgeschlossen und mit den Fettsäuren inkubiert.

| | |
|-------------|------------------------|
| Lysispuffer | 10 mM NaCl |
| | 100 mM Tris/HCl pH 7,3 |
| | 10 % (v/v) Glycerol |
| | 2 mM DTT |

1,5 ml Lysispuffer wurde zu den vor der Induktion geernteten Zell-Pellets und 5 ml zu den nach Induktion geernteten Zell-Pellets gegeben.

Die Zellen wurden durch vortexen resuspendiert und zum Zellaufschluss in flüssigem N₂ schockgefroren und danach bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Dieser Prozess wurde nochmals wiederholt. Der Aufschluss und das Scheren der genomischen DNA erfolgte nach vollständiger Resuspendierung der Zell-Pellets schließlich durch Ultraschall: 45 sec. bei 50 % Leistung im Eis. Anschließend wurden je 1,5 ml Lysat mit den umzusetzenden Fettsäuren bei 37°C unter schütteln 180 rpm, für 1 bis 3 h inkubiert.

Die Extraktion der Fettsäuren erfolgt nach der Methode von Bligh und Dyer durch Zugabe von 100 µl Eisessig, 900 µl 0, 1M Natriumphosphatpuffer pH 7,0; 2,5 ml Methanol

und 2,5 ml Chloroform. Der ganze Ansatz wurde 1 min geschüttelt, abzentrifugiert (4000 rpm, 10 min, RT d.h. bei ca. 23 °C). Die organische untere Phase wurde in ein Reagenzglas überführt und unter N₂ zur Trockene geblasen und mit 2 x 500 µl Chloroform in ein weiteres Reagenzglas überführt und wieder mit N₂ getrocknet. Die Rückstände wurden mit 400 µl gelöst.

Die so extrahierte Probe wurde mit 10 µl EDAC-Lösung [EDAC: N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-hydrochlorid, 1 mg/10 µl Methanol) versetzt und 2 h bei RT geschüttelt. Danach wurden 200 µl 0,1 M Tris/HCl-Lösung pH 7,5 und 1 ml Hexan zugegeben, kräftig geschüttelt (vortexen) und abzentrifugiert (5 min, 12000 rpm, RT). Die obere Phase wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die Extraktion mit 1 ml Hexan wiederholt. Die Hexanphasen wurden anschließend vereinigt und unter N₂-Strom bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 40 µl Acetonitril aufgenommen. 7 µl dieser Probe wurden für die GC-Analytik verwendet. Es wurde 1 µl in die GC injiziert.

- 15 Säule: HP-DB23 (Cross-Linked PEG), 30mx0,32mmx0,5µm
Flußrate: 1,5ml/min (konstanter Fluß) Helium 150°C
Injektion: 220°C
Ofen: 150°C (1 min), auf 200°C (15k/min), auf 250°C (2K/min), 250°C (5 min)
Detektion: FID 275°C
- 20 Die Tabelle 2 zeigt deutlich, dass die verschiedensten Fettsäuren als Substrate in der Reaktion umgesetzt werden. Je nach Substrat können konjugierte Diene und Triene oder Mischungen beider entstehen.

Tabelle 2: Umsetzungen der verschiedenen Fettsäuren

| Substrat | Position der Doppelbindung [ω] | Produkt [GC] | Produkt [HPLC] |
|---|---|---|--|
| 18:2(9Z, 12Z) | ω 6, ω 9 | nur konjugiertes Dien | nur konjugiertes Dien |
| 18:3(9Z, 12Z, 15Z)** | ω 3, ω 6, ω 9 | konjugiertes Trien (23%), konjugiertes Dien(2,6%)* | vor allem konjugiertes Trien |
| 18:3(6Z, 9Z, 12Z) | ω 6, ω 9, ω 12 | nur konjugiertes Dien | nur konjugiertes Dien |
| 20:3(8Z, 11Z, 14Z) | ω 6, ω 9, ω 12 | nur konjugiertes Dien | nur konjugiertes Dien |
| 20:3(11Z, 14Z, 17Z) | ω 3, ω 6, ω 9 | konjugiertes Trien [15,7 μ g], konjugiertes Dien [12 μ g] | vor allem konjugiertes Trien |
| 20:4(5Z, 8Z, 11Z, 14Z) | ω 6, ω 9, ω 12, ω 15 | konjugiertes Dien | konjugiertes Dien |
| 22:2(13Z, 16Z) | ω 6, ω 9 | konjugiertes Dien | konjugiertes Dien |
| 22:3(13Z, 16Z, 19Z) | ω 3, ω 6, ω 9 | konjugiertes Dien | vor allem konjugiertes Dien |
| 20:5(5Z, 8Z, 11Z, 14Z, 17Z) | ω 3, ω 6, ω 9, ω 12, ω 15 | konjugiertes Trien [60 μ g], konjugiertes Dien [59,4 μ g] | konjugiertes Trien : konjugiertes Dien (1:1) |
| 22:5(7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z) | ω 3, ω 6, ω 9, ω 12, ω 15 | Konjugiertes Trien [1 μ g], konjugiertes Dien [3,8 μ g] | Konjugiertes Trien : konjugiertes Dien (1:1) |
| 22:6(4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z) | ω 3, ω 6, ω 9, ω 12, ω 15, ω 18 | Konjugiertes Trien [7,1 μ g], konjugiertes Dien [5,7 μ g] | Konjugiertes Trien : konjugiertes Dien (1:1) |
| * da kein interner Standard mitgeführt wurde, ist nur prozentuale Aussage möglich | | | |
| ** das Substrat 18:3(9Z, 12Z, 15Z) wurde zur konjugierten Trien-Fettsäure 18:3(11E, 13E, 15Z) umgesetzt. Nachweis erfolgte über NMR-Analyse | | | |

55

Beispiel 6: Klonierung und Expression der Bifidobacterium breve Isomerase (= BBI) und der Lactobacillus reuteri Isomerase (= LRI)

5 Analog der unter Beispiel 1 bis 3 beschriebenen Beispiele wurden die Isomerasen aus Bifidobacterium breve Isomerase (= BBI) und der Lactobacillus reuteri Isomerase (= LRI) kloniert und in E. coli bzw. Hefe exprimiert.

Die Modifikation der BBI-Isomerase, das heißt die Anpassung des codon-usage erfolgte mit folgenden Primern:

10 BBI-5'-Primer: GGT ACC ATG GGT TAC TAC TCC TCC GGT AAC TAC GAA GCT
TTC GCT AGA CCA AAG AAG CCA GCT GGT GTT G
Primer enthält KpnI-Schnittstelle

BBI-3'-Primer: CTC GAG CAG ATC ACA TGG TAT TCG CGT AGC AG
Primer enthält eine XhoI-Schnittstelle

Die Original Bifidobacterium breve Isomerase Sequenz (SEQ ID NO: 9) lautet wie folgt:

atg --- tac tac agc agc ggc aac tat gag gcg ttt gcc cgt ccg aag aag cca gcc ggc gta g

15 Die Codon-usage optimierte modifizierte Sequenz (SEQ ID NO: 3) ergibt sich dann wie folgt:

atg **ggt tac tac tcc tcc ggt aac tac gaa gct ttc gct aga cca aag aag cca gct ggt gtt g**

Die Modifikation der LRI-Isomerase wurde mit den folgenden Primern durchgeführt:

20 LRI-5'-Primer: GAA TTC ACC ATG GGT TAC TAC TCC AAC GGT AAC TAC GAA
GCT TTC GCT AGA CCA AAG AAG CCA GCT GGT G
Primer enthält eine EcoRI-Schnittstelle

LRI-3'-Primer: CTC GAG TTA TAG TAA GTG CTG TTG CTC CAT TAA TTC
Primer enthält eine XhoI-Schnittstelle

25 Die Original Lactobacillus reuteri Isomerase Sequenz ist SEQ ID NO: 11 zu entnehmen. Die ersten Basenpaare der Nukleinsäuresequenz lauten wie folgt:

atg --- tat tat tca aac ggc aat tat gaa gcc ttt gct cga cca aag aag cct gct ggc g

Die entsprechende modifizierte Sequenz (SEQ ID NO: 5) lautet wie folgt:

atg **ggt tac tac tcc aac ggt aac tac gaa gct ttc gct aga cca aag aag cca gct ggt g**

56

Der PCR-Reaktionsansatz wurde mit Expand Fidelity-PCR-System von Roche Diagnostics durchgeführt und setzte sich wie folgt zusammen:

| | | |
|----|--|---------|
| | dNTP-Mix (10 mM) | 1,0 µl |
| | 5'-Forward Primer (10 µM) | 4,0 µl |
| 5 | 3'-Reverse Primer (10 µM) | 4,0 µl |
| | Template (1/50 verdünnte pSE380-PAI Plasmid-DNA) | 1,0 µl |
| | 10-Fach Puffer | 5,0 µl |
| | Polymerase (3,5 U /µl) | 0,5 µl |
| 10 | Wasser | 34,5 µl |
| | Gesamtvolumen | 50,0 µl |

Es wurde folgende PCR-Programm verwendet:

| | | | |
|----|-----|----------------|--------------------------------------|
| | 1. | 2 min | 94°C |
| | 2. | 30 sec | 94°C |
| 15 | 3. | 30 sec | 51°C |
| | 4. | 2 min | 72°C |
| | 5. | 10 x 2. bis 4. | |
| | 6. | 30 sec | 94°C |
| | 7. | 30 sec | 51°C |
| 20 | 8. | 2 min | 72°C, Zeitincrement 5 sec pro Zyklus |
| | 9. | 15 x 6. bis 8. | |
| | 10. | 5 min | 72°C |

Das amplifizierte DNA-Fragment wurde aus einem präparativen Agarosegel geschnitten, mit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience) eluiert und in den pGEM-T-Vector (Promega) nach Herstellerangaben kloniert. Nach einer Amplifikation der Plasmid-DNA in *E. coli*, wurde die Isomerase-cDNA über die KpnI und XhoI Schnittstellen bzw. EcoRI und XhoI Schnittstellen herausgeschnitten und die cDNA-Enden mit der T4-Polymerase geglättet. pYES2 Vektor wurde mit EcoRI geöffnet, die cDNA-Enden mit der T4-Polymerase geglättet und mit einer alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Beide DNA-Fragmente wurden mit der T4-Ligase zueinander legiert und die Insertionsrichtung durch einen BamHI-Verdau überprüft. Das so hergestellte pY2-PAI-Konstrukt wurde in *E. coli* amplifiziert und zur Hefe-Expression in den Hefestamm INVSc1 (Invitrogen) mit der LiAc-Methode (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1995) transformiert. Wurde eine Klonierung im pET24a-Vektor vorgenommen, so wurde der Vektor mit denselben Enzymen zur Klonierung geschnitten und die Isomerasegene über diese Schnittstellen in den Vektor mit Hilfe der T4-Ligase kloniert.

Die Analysen der Fettsäuren erfolgten wie unter den Beispielen für die *Propionibacterium acnes* beschrieben.

57

Beispiel 7: Expression der Bifidobacterium breve Isomerase (= BBI) und der Lactobacillus reuteri Isomerase (= LRI) in Pflanzen

- Die Expression der Isomerase aus Bifidobacterium breve oder Lactobacillus reuteri in transgenen Pflanzen ist vorteilhaft, um den CLA-Gehalt in diesen Pflanzen zu erhöhen.
- 5 Dazu wurde die cDNA, die für die Isomerasen kodieren in binäre Vektoren kloniert und über Agrobacterium-vermittelten DNA-Transfer in Arabidopsis thaliana, Nicotiana tabacum, Brassica napus und Linum usitatissimum übertragen. Die Expression der Isomerasen-cDNA stand dabei unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV 35 S-Promotors bzw. des samenspezifischen USP-Promotors.
- 10 Arabidopsis ist als Modellpflanze besonders geeignet, da sie eine kurze Generationszeit und ausreichende Mengen an Linolsäure, dem Substrat der Isomerase zur Herstellung von CLA.
- Tabak und Hoch-Linolsäure-Sorten von Lein, wie die Varietät Linola, sind als Ölsaaten mit einem hohen Gehalt an Linolsäure besonders geeignet zur heterologen Expression von Isomerase-Genen, da Linolsäure das Substrat der Isomerasen zur Bildung von konjugierter Linolsäure darstellt.
- 15 Als Expressionsvektoren wurden der Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science, 66, 1990: 221 - 230) bzw. das pBinAR Derivat pBinAR-USP, bei dem der CaMV 35 S-Promotor gegen den USP-Promotor aus V. faba ausgetauscht war, verwendet. Ebenfalls verwendet wurden die Vektoren pGPTV und pGPTV-USP. Zur Umklonierung mußte die Isomerase-cDNA aus dem Vektor pGEM-T ausgeschnitten und in pBinAR bzw. pBinAR-USP kloniert werden.
- 20 Die entstandenen Plasmide wurden in Agrobacterium tumefaciens transformiert (Höfgen und Willmitzer, Nucl. Acids Res., 16, 1988: 9877). Die Transformation von A. thaliana erfolgte mittels "floral dip" (Clough und Bent, Plant Journal, 16, 1998: 735 - 743), die von N. tabacum über Cokultivierung von Tabakblattstückchen mit transformierten A. tumefaciens Zellen, die von Lein und Raps durch Cokultivierung von Hypokotylstücken mit transformierten A. tumefaciens Zellen.
- 25 Die Expression der Isomerase-Gene in transgenen Arabidopsis-, Tabak-, Raps- und Leinpflanzen wurde über Northern-Blot Analyse untersucht. Ausgewählte Pflanzen wurden auf ihren Gehalt an CLA im Samenöl untersucht.
- 30 Analog zum USP-Promotor kann auch der Napin-Promotor verwendet werden, um eine samenspezifische Expression der Isomerase zu erreichen.
- Tabelle 3 gibt die Ergebnisse in Pflanzen wieder.

Tabelle 3: Zusammenstellung der Experimente in transgenen Tabakpflanzen

Fettsäuregehalte in %

5 mg Tabaksamen (*Nicotiana tabacum* var. SNN) transformiert mit pCAMBIA- PAI-USP, transmethyliert

| 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 (9z) | 18:1(11z) | 18:2 | 18:2 (10E,12Z) | a18:3LeA | Pfl.Nr. |
|------|------|------|-----------|-----------|------|----------------|----------|---------|
| FA% | FA% | FA% | FA% | FA% | FA% | FA% | FA% | |
| 9,3 | 0,1 | 3,2 | 11,1 | 0,4 | 75,8 | 0,0 | 0,2 | SNNWT1 |
| 9,2 | 0,1 | 3,1 | 11,1 | 0,4 | 75,8 | 0,0 | 0,2 | SNNWT2 |
| 9,3 | 0,1 | 3,3 | 11,2 | 0,4 | 75,5 | 0,0 | 0,2 | SNNWT3 |
| 8,7 | 0,1 | 3,1 | 10,9 | 0,4 | 76,4 | 0,2 | 0,2 | F86.1 |
| 10,3 | 0,2 | 3,0 | 10,3 | 0,5 | 75,5 | 0,0 | 0,2 | F86.2 |
| 9,1 | 0,1 | 3,2 | 10,6 | 0,4 | 76,3 | 0,1 | 0,2 | F86.3 |
| 8,9 | 0,1 | 3,1 | 10,6 | 0,5 | 76,6 | 0,0 | 0,2 | F86.5 |
| 8,9 | 0,1 | 2,5 | 9,2 | 0,6 | 78,5 | 0,0 | 0,2 | F86.7 |
| 9,0 | 0,1 | 3,0 | 8,0 | 0,5 | 79,2 | 0,0 | 0,2 | F86.8 |
| 8,0 | 0,1 | 2,7 | 8,6 | 0,5 | 79,8 | 0,1 | 0,2 | F86.9 |
| 8,7 | 0,1 | 3,0 | 11,1 | 0,4 | 76,4 | 0,1 | 0,2 | F86.10 |
| 8,7 | 0,1 | 3,0 | 11,3 | 0,5 | 76,0 | 0,2 | 0,2 | F86.11 |
| 8,7 | 0,1 | 3,0 | 11,0 | 0,4 | 76,6 | 0,1 | 0,2 | F86.12 |
| 9,8 | 0,1 | 3,5 | 12,2 | 0,5 | 73,5 | 0,0 | 0,3 | F86.13 |
| 9,4 | 0,1 | 3,5 | 10,6 | 0,4 | 75,7 | 0,0 | 0,2 | F86.14 |
| 8,6 | 0,1 | 2,9 | 10,9 | 0,4 | 76,8 | 0,1 | 0,2 | F86.15 |

| 8,0 | 0,1 | 2,6 | 10,0 | 0,7 | 78,3 | 0,1 | 0,2 | F86.16 |
|------|------|------|-----------|-----------|------|--------------------|----------|---------|
| 16:0 | 16:1 | 18:0 | 18:1 (9z) | 18:1(11z) | 18:2 | 18:2 (10E, 12Z) | a18:3LeA | Pfl.Nr. |
| FA% | FA% | FA% | FA% | FA% | FA% | FA% | FA% | |
| 8,5 | 0,1 | 3,0 | 10,7 | 0,4 | 77,1 | 0,0 | 0,2 | F86.17 |
| 9,2 | 0,1 | 3,2 | 10,7 | 0,5 | 76,1 | 0,0 | 0,2 | F86.18 |
| 7,9 | 0,1 | 2,5 | 10,3 | 0,7 | 78,2 | 0,1 | 0,2 | F86.19 |
| 8,8 | 0,1 | 3,2 | 11,0 | 0,5 | 76,2 | 0,0 | 0,2 | F86.20 |
| 8,4 | 0,1 | 2,8 | 10,7 | 0,4 | 77,4 | 0,0 | 0,2 | F86.21 |
| 9,5 | 0,1 | 3,0 | 7,3 | 0,4 | 79,5 | 0,0 | 0,2 | F86.22 |
| 8,6 | 0,1 | 3,0 | 11,0 | 0,4 | 76,6 | 0,1 | 0,2 | F86.25 |
| 9,1 | 0,1 | 3,0 | 12,2 | 0,5 | 74,8 | 0,1 | 0,2 | F86.26 |
| 8,4 | 0,1 | 2,7 | 10,2 | 0,5 | 78,0 | 0,0 | 0,2 | F86.27 |
| 7,8 | 0,1 | 2,2 | 9,6 | 0,7 | 79,5 | 0,0 | 0,2 | F86.28 |
| 9,2 | 0,1 | 3,2 | 10,9 | 0,4 | 75,9 | 0,1 | 0,2 | F86.29 |
| 9,1 | 0,1 | 3,4 | 11,4 | 0,5 | 75,2 | 0,1 | 0,2 | F86.32 |
| 9,3 | 0,1 | 3,4 | 12,1 | 0,4 | 74,3 | 0,2 | 0,2 | F86.33 |
| 9,0 | 0,1 | 3,0 | 11,0 | 0,4 | 76,1 | 0,2 | 0,2 | F86.34 |
| 9,1 | 0,1 | 3,2 | 11,5 | 0,5 | 75,4 | 0,1 | 0,2 | F86.35 |

Resultat: in 16 von 29 transgenen Linien konnte CLA (18:2, Δ10E, 12Z) nachgewiesen werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in transgenen eukaryontischen Organismen gelöst, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:
- 5
- a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 in einen ungesättigte Fettsäuren produzierenden Organismus; oder
- 10
- b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz, die sich durch Rückübersetzung in eine Nukleinsäuresequenz von der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenz aufgrund des degenerierten genetischen Codes ableitet, oder
- 15
- c) Einbringen mindestens eines Derivates der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 90 % Identität auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich verändert ist, und
- 20
- d) Expression der Nukleinsäure im nach (a), (b) oder (c) hergestellten Organismus, und
- b) Anzucht und Ernte des nach (a), (b) oder (c) hergestellten Organismus.
2. Verfahren zur Herstellung von konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäure um konjugierte Linolsäure handelt.
- 25
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die im Organismus enthaltenen Öle bzw. die im Organismus enthaltenen Triglyceride isoliert werden.
- 30
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die im Öl oder in den Triglyceriden enthaltenden Fettsäuren freigesetzt werden.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem transgenen eukaryontischen Organismus um einen Öl-produzierenden Organismus handelt.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem transgenen eukaryontischen Organismus um eine Pflanze, eine Hefe oder einen Pilz handelt.
- 5 7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der transgenen Pflanze um eine Alge, eine Ölfruchtpflanze ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Safflor (Färberdistel), Mohn, Senf, Hanf, Rhizinus, Olive, Sesam, Calendula, Punica, Nachtkerze, Königskerze, Distel, Wildrosen, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Ölpalme, Kokosnuss oder 10 Walnuss oder eine Feldfruchtpflanze ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Kartoffel, Tabak, Aubergine, Tomate, Erbse, Alfalfa, Kaffee, Kakao oder Tee handelt.
- 15 8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass in den transgenen eukaryontischen Organismus zusätzlich mindestens eine weitere Nukleinsäure eingebracht wird, die für ein Polypeptid der Fettsäurebiosynthese codiert.
- 20 9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere Nukleinsäure, die für ein Polypeptid der Fettsäurebiosynthese codiert, ausgewählt ist aus der Gruppe der Nukleinsäuresequenzen, die für eine Acyl-CoA-Dehydrogenase, eine Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase, eine Acyl-ACP-Thioesterase, eine Fettsäure-Acyl-Transferase, eine Fettsäure-Synthase, eine Fettsäure-Hydroxylase, eine Acetyl-Coenzym A-Carboxylase, eine Acyl-Coenzym A-Oxidase, eine Fettsäure-Desaturase, eine Fettsäure-Acetylenase, 25 eine Lipoxygenase, eine Triacylglycerol-Lipase, eine Allenoxid-Synthase, eine Hydroperoxid-Lyase, einen Fettsäuretransporter oder eine Fettsäure-Elongase codieren.
- 30 10. Öle, Triglyceride oder Fettsäuregemisch mit einem erhöhten Gehalt an konjugierter mehrfach ungesättigter Fettsäuren, hergestellt nach einem Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 9.
11. Öle oder Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an konjugierter Linolsäure, hergestellt nach einem Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 10.
12. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe:
35 a) Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5, oder

62

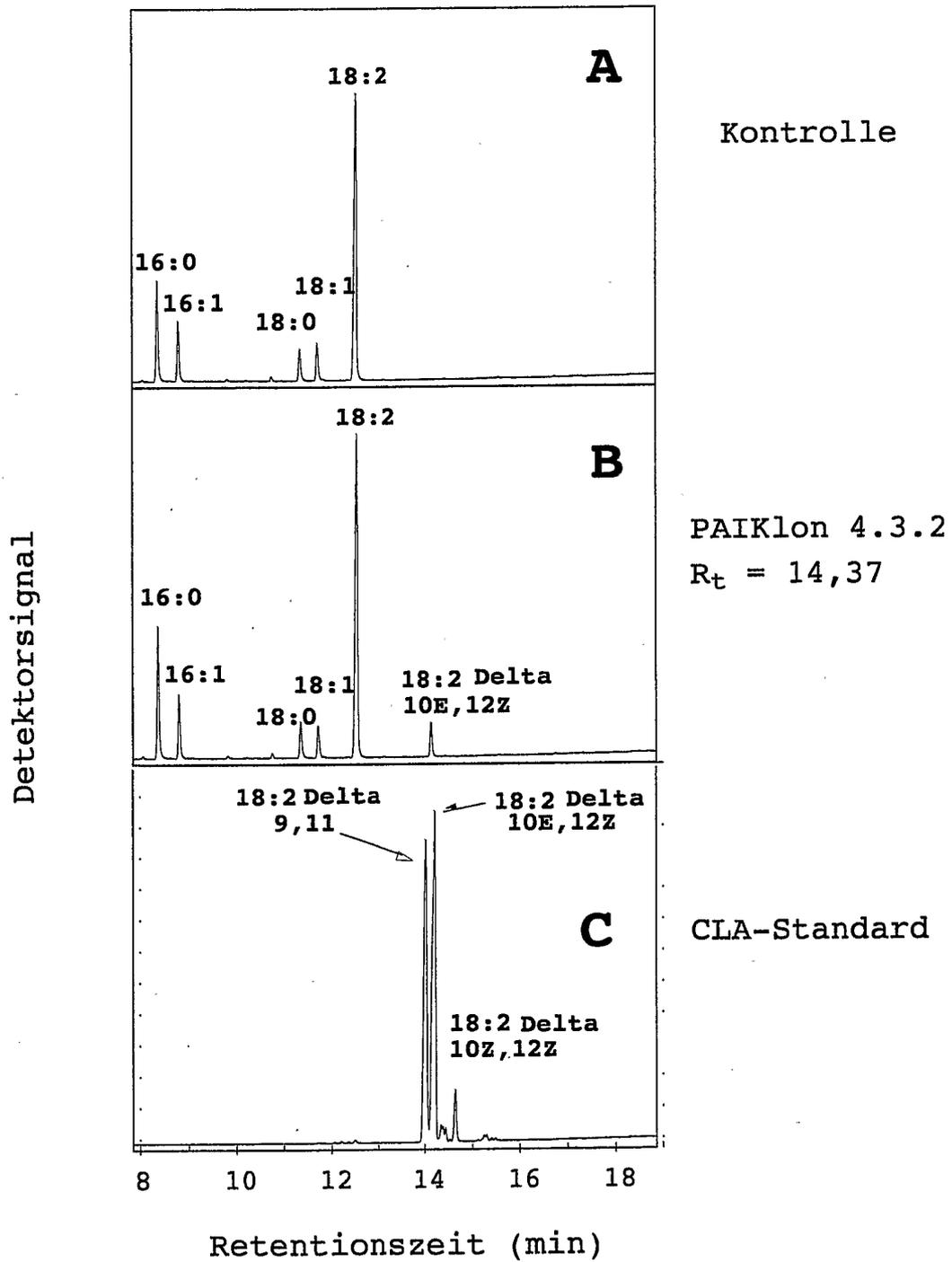
- b) Nukleinsäuresequenz, die sich durch Rückübersetzung in eine Nukleinsäuresequenz von der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenz aufgrund des degenerierten genetischen Codes ableitet, oder
- 5 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 90 % Identität auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich verändert ist, oder
- 10 d) einer Nukleinsäuresequenz, die sich von dem prokaryontischen codon-usage der Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 11 durch mindestens 0,5 %, vorteilhaft mindestens 1, 2, 3 oder 5 % bevorzugt mindestens 6, 7, 8, 9 oder 10 %, besonders bevorzugt mindestens 20, 30, 40 oder 50 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 60, 70, 80 oder 90
- 15 % eines eukaryontischen codon-usage unterscheidet, oder
- e) Derivate der unter (d) beanspruchten Nukleinsäuresequenzen, die um mindestens ein, vorteilhaft mindestens 2, bevorzugt mindestens 3, besonders bevorzugt mindestens 4, ganz besonders bevorzugt mindestens 5 - Codontripletts vorteilhaft am 5' Ende der Nukleinsäuresequenzen, die für eine Aminosäure codieren, verlängert ist, ohne dass die enzymatische Wirkung
- 20 der durch die Nukleinsäuren codierten Polypeptide wesentlich verändert ist,
- zur Herstellung von transgenen Pflanzen.
13. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 12 oder eines Fragmentes davon zur Isolierung einer Nukleinsäuresequenz über Homologiescreening.
- 25 14. Verwendung von Triglyceriden oder Fettsäuregemischen gemäß Anspruch 10 oder 11 mit einem erhöhten Gehalt an konjugierter mehrfach ungesättigter Fettsäuren oder konjugierter Linolsäure zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Futtermitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.
- 30 15. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit Isomeraseaktivität codiert ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 dargestellten Sequenz, oder
- b) einer Nukleinsäuresequenz, die sich durch Rückübersetzung in eine Nukleinsäuresequenz von der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6
- 35 dargestellten Aminosäuresequenz aufgrund des degenerierten genetischen Codes ableitet, oder

- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 90 % Identität auf Aminosäureebene aufweisen, oder
- 5 d) einer Nukleinsäuresequenz, die sich von dem prokaryontischen codon-usage der Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 11 durch mindestens 0,5 %, vorteilhaft mindestens 1, 2, 3 oder 5 % bevorzugt mindestens 6, 7, 8, 9 oder 10 %, besonders bevorzugt mindestens 20, 30, 40 oder 50 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 60, 70, 80 oder 90 % eines
- 10 eukaryontischen codon-usage unterscheidet, oder
- e) Derivate der unter (d) beanspruchten Nukleinsäuresequenzen, die um mindestens ein, vorteilhaft mindestens 2, bevorzugt mindestens 3, besonders bevorzugt mindestens 4, ganz besonders bevorzugt mindestens 5 Codontripletts vorteilhaft am 5' Ende der Nukleinsäuresequenzen, die für eine Aminosäure codieren, verlängert ist, ohne dass die enzymatische Wirkung der durch die Nukleinsäuren codierten Polypeptide wesentlich verändert ist.
- 15
16. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die unter (d) codon-usage am aminoterminalen Ende eingeführt wird.
17. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 14 (d) und (e) oder Anspruch 16.
- 20
18. Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 15 oder 16, wobei die Nukleinsäuresequenz mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
19. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 15 oder 16 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 18.
- 25
20. Transgener Organismus, enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 15 oder 16, mindestens ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 18 oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 19.
21. Transgener Organismus nach Anspruch 20, wobei es sich bei dem Organismus um eine Hefe, einen Pilz oder eine Pflanze handelt.
- 30
22. Lebensmittel-, Nahrungsergänzungsmittel-, Tierfuttermittel- oder Arzneimittelzubereitung, enthaltend Öle oder Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an konjugierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder konjugierter Linolsäure gemäß Anspruch 10 oder 11.
23. Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure mit transgenen eukaryontischen Organismen, dadurch gekennzeichnet, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:
- 35

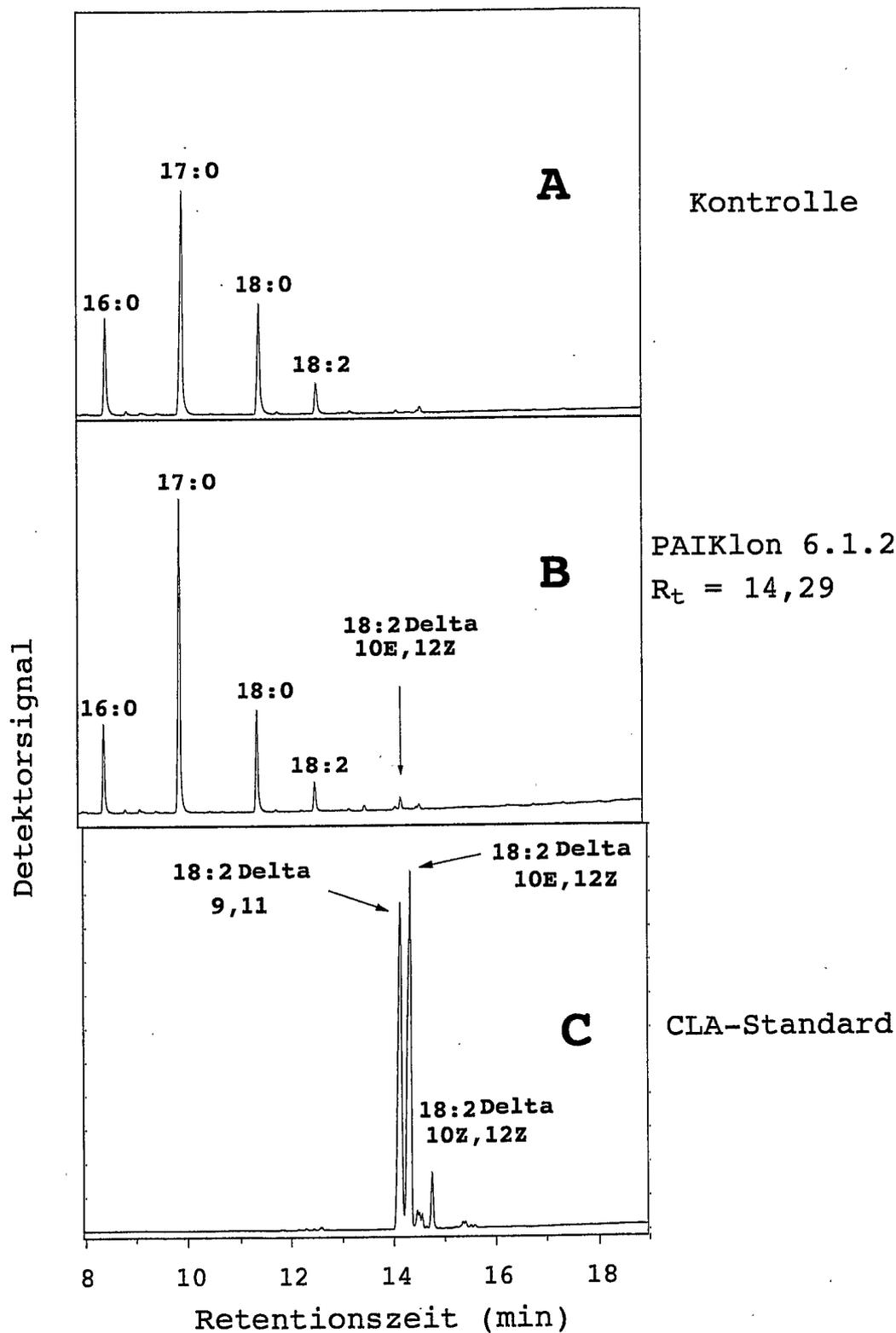
64

- 5 a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 in einen ungesättigte Fettsäuren produzierenden Organismus; oder
- b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz, die sich durch Rückübersetzung in eine Nukleinsäuresequenz von der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenz aufgrund des degenerierten genetischen Codes ableitet, oder
- 10 c) Einbringen mindestens eines Derivates der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 90 % Identität auf Aminosäureebene aufweisen, ohne dass die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich verändert ist, oder
- 15 d) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz, die sich von dem prokaryontischen codon-usage der Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 11 durch mindestens 0,5 % eines eukaryontischen codon-usage unterscheidet, oder
- 20 e) Einbringen mindestens eines Derivate der unter (d) beanspruchten Nukleinsäuresequenzen, die um mindestens ein Codontriplett der Nukleinsäuresequenzen, das für eine Aminosäure codiert, verlängert ist, ohne dass die enzymatische Wirkung der durch die Nukleinsäuren codierten Polypeptide wesentlich verändert ist.
- f) Expression der Nukleinsäure im nach (a), (b), (c), (d) oder (e) hergestellten Organismus.
- 25 24. Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass dem Organismus Linolsäure gefüttert wird.
25. Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass der nach (a), (b), (c), (d) oder (e) hergestellte Organismus angezogen und geerntet wird.
- 30 25. Verfahren zur Herstellung von konjugierter Linolsäure nach den Ansprüchen 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass der Organismus aufgeschlossen wird und die Umsetzung von Linolensäure zu CLA in vitro erfolgt.

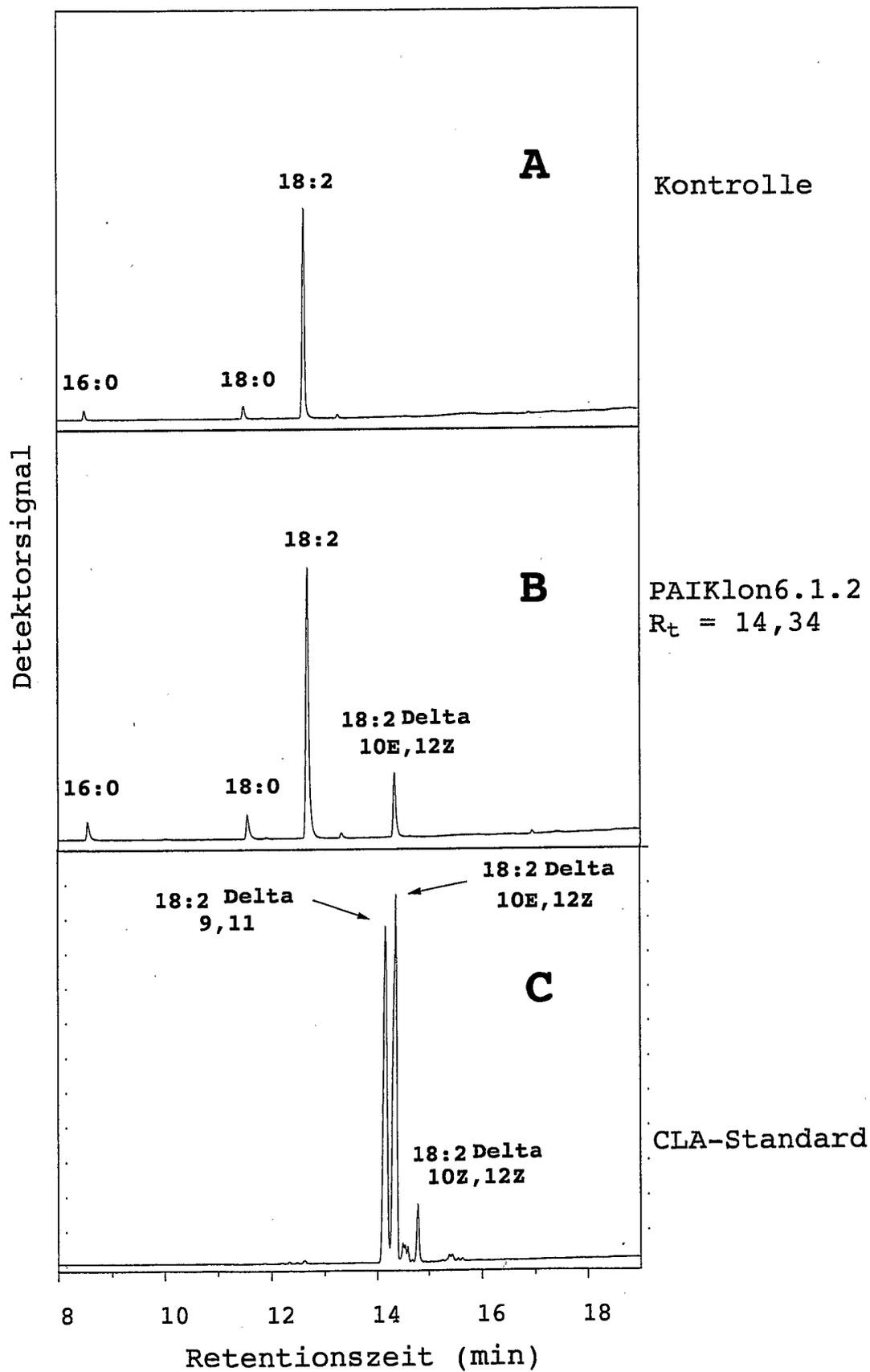
Figur 1/5: Hefeexpression PAI - transmethyliert



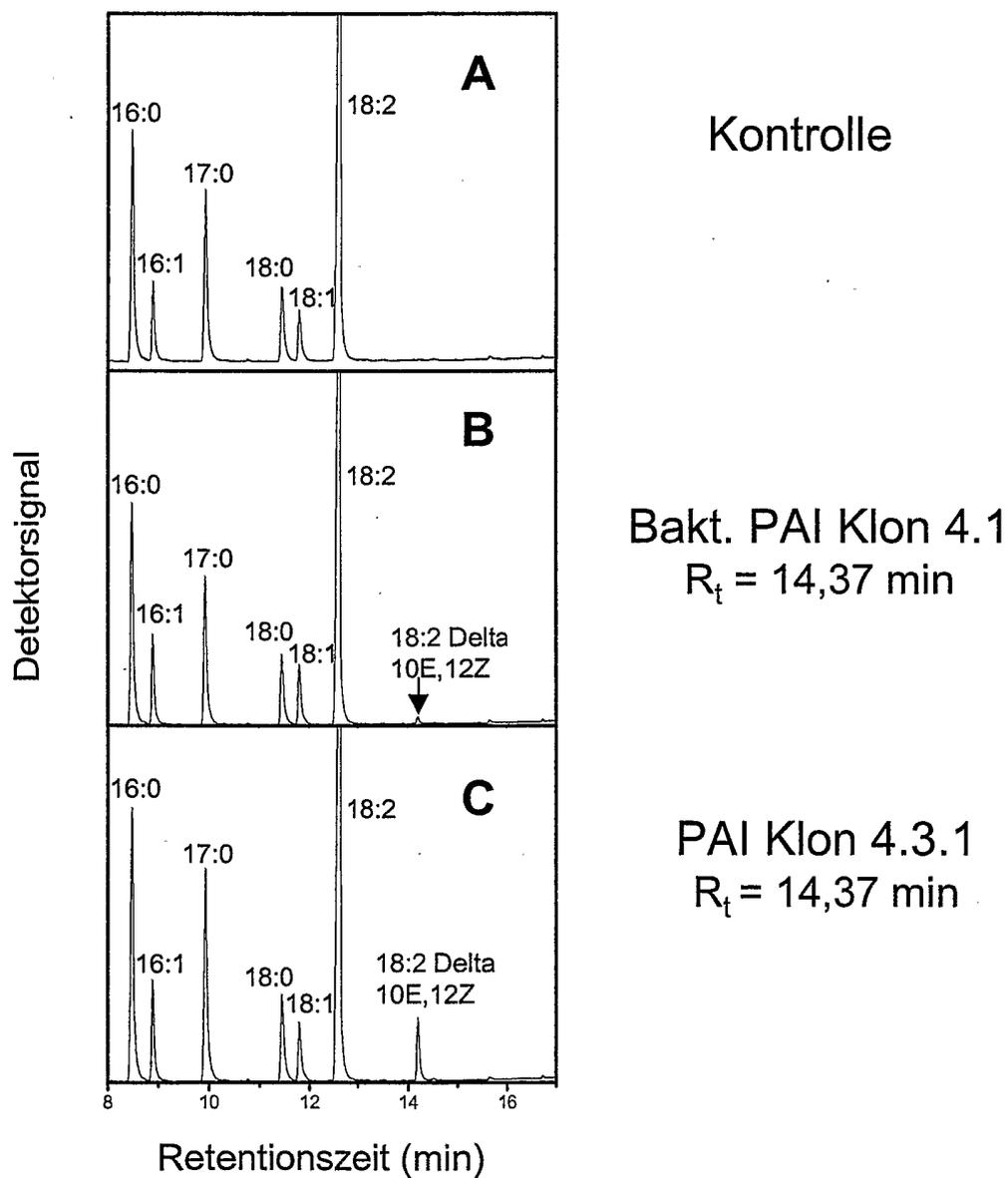
Figur 2/5: Hefeexpression PAI - methyliert



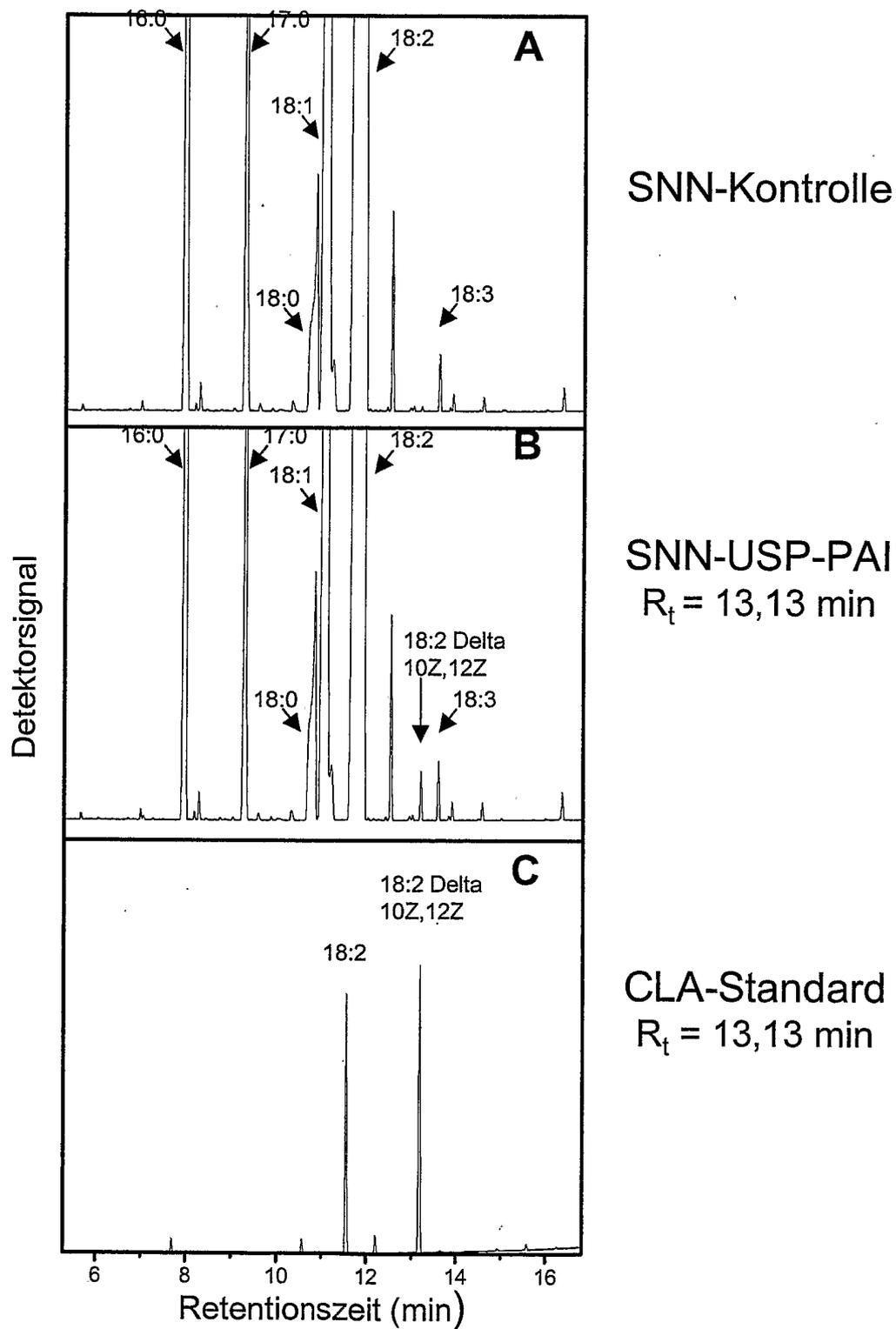
Figur 3/5: Hefeexpression PAI - mechanischer Aufschluss



Figur 4/5: Hefeexpression bakterielle PAI - transmethyliert



Figur 5/5: Tabaksamen transmethylert



SEQUENCE LISTING

5 <110> BASF Plant Science GmbH

<120> Verfahren zur Herstellung von konjugierten mehrfach ungesättigten
10 Fettsäuren mit mindestens drei Doppelbindungen in Pflanzen

<130> 2002_823
15

<160> 12
20

<170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 1278

30 <212> DNA

<213> Propionibacterium acnes

35 <220>

<221> CDS

40 <222> (1) .. (1278)

<223>

45 <400> 1

atg ggt tcc att tcc aag gac tcc aga att gct att att ggt gct ggc 48
Met Gly Ser Ile Ser Lys Asp Ser Arg Ile Ala Ile Ile Gly Ala Gly
1 5 10 15

| | | |
|----|---|-----|
| | ccg gcc ggg ctg gct gcc gga atg tac ctc gaa cag gcc gga ttt cac | 96 |
| | Pro Ala Gly Leu Ala Ala Gly Met Tyr Leu Glu Gln Ala Gly Phe His | |
| | 20 25 30 | |
| 5 | | |
| | gac tac acg atc ctg gaa cgc acc gac cac gtc gga ggc aag tgc cac | 144 |
| | Asp Tyr Thr Ile Leu Glu Arg Thr Asp His Val Gly Gly Lys Cys His | |
| | 35 40 45 | |
| 10 | | |
| | tca ccg aac tac cac ggc cgt cgt tat gag atg ggg gcc atc atg ggc | 192 |
| | Ser Pro Asn Tyr His Gly Arg Arg Tyr Glu Met Gly Ala Ile Met Gly | |
| | 50 55 60 | |
| 15 | | |
| | gtc ccc agt tac gac acc atc cag gag atc atg gat cgc act ggc gac | 240 |
| | Val Pro Ser Tyr Asp Thr Ile Gln Glu Ile Met Asp Arg Thr Gly Asp | |
| | 65 70 75 80 | |
| 20 | | |
| | aag gtc gac ggg ccg aaa ctg cgt cgc gag ttc ctg cac gag gac ggc | 288 |
| | Lys Val Asp Gly Pro Lys Leu Arg Arg Glu Phe Leu His Glu Asp Gly | |
| | 85 90 95 | |
| 25 | | |
| | gag atc tac gtc ccg gaa aag gat cca gtg cgt ggt ccg cag gtc atg | 336 |
| | Glu Ile Tyr Val Pro Glu Lys Asp Pro Val Arg Gly Pro Gln Val Met | |
| | 100 105 110 | |
| 30 | | |
| | gca gca gtg cag aag ctg ggc cag ttg ctc gcg acg aag tac cag gga | 384 |
| | Ala Ala Val Gln Lys Leu Gly Gln Leu Leu Ala Thr Lys Tyr Gln Gly | |
| | 115 120 125 | |
| 35 | | |
| | tat gac gcc aac ggc cac tac aac aag gtt cac gag gac ctc atg ctg | 432 |
| | Tyr Asp Ala Asn Gly His Tyr Asn Lys Val His Glu Asp Leu Met Leu | |
| | 130 135 140 | |
| 40 | | |
| | ccc ttc gac gag ttc ctc gcc ctc aac ggg tgc gag gcc gcc cga gac | 480 |
| | Pro Phe Asp Glu Phe Leu Ala Leu Asn Gly Cys Glu Ala Ala Arg Asp | |
| | 145 150 155 160 | |
| 45 | | |
| | ctg tgg atc aac ccc ttc acg gcc ttc ggc tac ggg cac ttc gac aac | 528 |
| | Leu Trp Ile Asn Pro Phe Thr Ala Phe Gly Tyr Gly His Phe Asp Asn | |
| | 165 170 175 | |
| 50 | | |
| | gtc ccg gcc gcc tac gtg ctg aag tac ctc gac ttc gtc acc atg atg | 576 |
| | Val Pro Ala Ala Tyr Val Leu Lys Tyr Leu Asp Phe Val Thr Met Met | |
| | 180 185 190 | |
| 55 | | |
| | tcc ttt gcc aag gga gat ctg tgg acg tgg gcc gac ggc acc cag gcg | 624 |
| | Ser Phe Ala Lys Gly Asp Leu Trp Thr Trp Ala Asp Gly Thr Gln Ala | |
| | 195 200 205 | |

atg ttc gag cac ctc aac gcc acc ctg gag cac ccg gcc gaa cgc aac 672
 Met Phe Glu His Leu Asn Ala Thr Leu Glu His Pro Ala Glu Arg Asn
 210 215 220

5

gtt gac atc act cgc atc acc cgc gag gac ggc aag gtc cac att cac 720
 Val Asp Ile Thr Arg Ile Thr Arg Glu Asp Gly Lys Val His Ile His
 225 230 235 240

10

acc acg gac tgg gat cgc gag tcc gac gtc ctc gtc ctc acc gtc ccg 768
 Thr Thr Asp Trp Asp Arg Glu Ser Asp Val Leu Val Leu Thr Val Pro
 245 250 255

15

ctg gaa aag ttc ctc gac tac tcc gac gcg gac gat gac gag cgg gag 816
 Leu Glu Lys Phe Leu Asp Tyr Ser Asp Ala Asp Asp Asp Glu Arg Glu
 260 265 270

20

tac ttc tcg aag atc atc cac cag cag tac atg gtg gat gcc tgc ctg 864
 Tyr Phe Ser Lys Ile Ile His Gln Gln Tyr Met Val Asp Ala Cys Leu
 275 280 285

25

gtg aag gag tac ccg acc atc tcc ggg tac gtc ccc gac aac atg agg 912
 Val Lys Glu Tyr Pro Thr Ile Ser Gly Tyr Val Pro Asp Asn Met Arg
 290 295 300

30

ccc gaa cgt ctc ggg cac gtc atg gtt tac tac cac cgc tgg gct gat 960
 Pro Glu Arg Leu Gly His Val Met Val Tyr Tyr His Arg Trp Ala Asp
 305 310 315 320

35

gat ccg cac cag atc atc acg acc tac ctg cta cgt aac cat ccg gac 1008
 Asp Pro His Gln Ile Ile Thr Thr Tyr Leu Leu Arg Asn His Pro Asp
 325 330 335

40

tac gcg gac aag act cag gag gag tgc cgc cag atg gtc ctc gac gac 1056
 Tyr Ala Asp Lys Thr Gln Glu Glu Cys Arg Gln Met Val Leu Asp Asp
 340 345 350

45

atg gag acc ttc ggt cat ccg gtc gag aag atc atc gag gag cag acc 1104
 Met Glu Thr Phe Gly His Pro Val Glu Lys Ile Ile Glu Glu Gln Thr
 355 360 365

tgg tac tac ttc ccg cac gtt agc tcg gag gac tac aag gcc ggg tgg 1152
 Trp Tyr Tyr Phe Pro His Val Ser Ser Glu Asp Tyr Lys Ala Gly Trp
 370 375 380

tac gag aag gtc gag gga atg cag ggt cgt cgc aac acc ttc tac gcc 1200
 Tyr Glu Lys Val Glu Gly Met Gln Gly Arg Arg Asn Thr Phe Tyr Ala
 385 390 395 400

gga gaa att atg agt ttc ggt aat ttc gac gag gtg tgc cac tac tcg 1248
 Gly Glu Ile Met Ser Phe Gly Asn Phe Asp Glu Val Cys His Tyr Ser
 405 410 415

5

aag gac ctg gtg acg cgg ttc ttc gtg tga 1278
 Lys Asp Leu Val Thr Arg Phe Phe Val
 420 425

10

<210> 2

<211> 425

15 <212> PRT

<213> Propionibacterium acnes

20

<400> 2

Met Gly Ser Ile Ser Lys Asp Ser Arg Ile Ala Ile Ile Gly Ala Gly
 1 5 10 15

25

Pro Ala Gly Leu Ala Ala Gly Met Tyr Leu Glu Gln Ala Gly Phe His
 20 25 30

30

Asp Tyr Thr Ile Leu Glu Arg Thr Asp His Val Gly Gly Lys Cys His
 35 40 45

35

Ser Pro Asn Tyr His Gly Arg Arg Tyr Glu Met Gly Ala Ile Met Gly
 50 55 60

40

Val Pro Ser Tyr Asp Thr Ile Gln Glu Ile Met Asp Arg Thr Gly Asp
 65 70 75 80

Lys Val Asp Gly Pro Lys Leu Arg Arg Glu Phe Leu His Glu Asp Gly
 85 90 95

45

Glu Ile Tyr Val Pro Glu Lys Asp Pro Val Arg Gly Pro Gln Val Met
 100 105 110

Ala Ala Val Gln Lys Leu Gly Gln Leu Leu Ala Thr Lys Tyr Gln Gly
 115 120 125
 5

Tyr Asp Ala Asn Gly His Tyr Asn Lys Val His Glu Asp Leu Met Leu
 130 135 140

10

Pro Phe Asp Glu Phe Leu Ala Leu Asn Gly Cys Glu Ala Ala Arg Asp
 145 150 155 160

15

Leu Trp Ile Asn Pro Phe Thr Ala Phe Gly Tyr Gly His Phe Asp Asn
 165 170 175

20

Val Pro Ala Ala Tyr Val Leu Lys Tyr Leu Asp Phe Val Thr Met Met
 180 185 190

25

Ser Phe Ala Lys Gly Asp Leu Trp Thr Trp Ala Asp Gly Thr Gln Ala
 195 200 205

30

Met Phe Glu His Leu Asn Ala Thr Leu Glu His Pro Ala Glu Arg Asn
 210 215 220

35

Val Asp Ile Thr Arg Ile Thr Arg Glu Asp Gly Lys Val His Ile His
 225 230 235 240

40

Thr Thr Asp Trp Asp Arg Glu Ser Asp Val Leu Val Leu Thr Val Pro
 245 250 255

45

Leu Glu Lys Phe Leu Asp Tyr Ser Asp Ala Asp Asp Asp Glu Arg Glu
 260 265 270

Tyr Phe Ser Lys Ile Ile His Gln Gln Tyr Met Val Asp Ala Cys Leu
 275 280 285

Val Lys Glu Tyr Pro Thr Ile Ser Gly Tyr Val Pro Asp Asn Met Arg
 290 295 300

5 Pro Glu Arg Leu Gly His Val Met Val Tyr Tyr His Arg Trp Ala Asp
 305 310 315 320

Asp Pro His Gln Ile Ile Thr Thr Tyr Leu Leu Arg Asn His Pro Asp
 325 330 335

10 Tyr Ala Asp Lys Thr Gln Glu Glu Cys Arg Gln Met Val Leu Asp Asp
 340 345 350

15 Met Glu Thr Phe Gly His Pro Val Glu Lys Ile Ile Glu Glu Gln Thr
 355 360 365

20 Trp Tyr Tyr Phe Pro His Val Ser Ser Glu Asp Tyr Lys Ala Gly Trp
 370 375 380

25 Tyr Glu Lys Val Glu Gly Met Gln Gly Arg Arg Asn Thr Phe Tyr Ala
 385 390 395 400

Gly Glu Ile Met Ser Phe Gly Asn Phe Asp Glu Val Cys His Tyr Ser
 405 410 415

30 Lys Asp Leu Val Thr Arg Phe Phe Val
 420 425

35 <210> 3
 <211> 1881
 <212> DNA

40 <213> Bifidobacterium breve

45 <220>
 <221> CDS

| | | |
|----|--|-------------|
| | Asp Leu Tyr Asp Lys Pro Ile Thr Asp Phe Phe Asp Asp Glu Val Leu | |
| | 165 | 170 175 |
| 5 | aac tcc aac ttc tgg ctg tac tgg cgt acc atg ttc gct ttt gaa aat Asn Ser Asn Phe Trp Leu Tyr Trp Arg Thr Met Phe Ala Phe Glu Asn | 576 |
| | 180 | 185 190 |
| 10 | tgg cat tca gcg ttg gaa atg aag ctg tac atc aag cgc tac att cat Trp His Ser Ala Leu Glu Met Lys Leu Tyr Ile Lys Arg Tyr Ile His | 624 |
| | 195 | 200 205 |
| 15 | cac atc ggc ggc ttg ccg gac ttc tcc gca ctg cga ttc acc cgc tac His Ile Gly Gly Leu Pro Asp Phe Ser Ala Leu Arg Phe Thr Arg Tyr | 672 |
| | 210 | 215 220 |
| 20 | aac cag tac gag tcg atg att ttg ccc atg gtc aaa tat ctg gaa tct Asn Gln Tyr Glu Ser Met Ile Leu Pro Met Val Lys Tyr Leu Glu Ser | 720 |
| | 225 | 230 235 240 |
| 25 | cat ggc gtg gaa ttc cga tac aac acc aag gtc gag aac gtc gaa ttc His Gly Val Glu Phe Arg Tyr Asn Thr Lys Val Glu Asn Val Glu Phe | 768 |
| | 245 | 250 255 |
| 30 | gcc atc ggt ggg gga gac ggc ccc aag cgc gag cat act ggc gtc gga Ala Ile Gly Gly Gly Asp Gly Pro Lys Arg Glu His Thr Gly Val Gly | 816 |
| | 260 | 265 270 |
| 35 | caa gac acc atc cag aaa atc cag gcc act tcc ggt ttc ttc aag cgc Gln Asp Thr Ile Gln Lys Ile Gln Ala Thr Ser Gly Phe Phe Lys Arg | 864 |
| | 275 | 280 285 |
| 40 | aat cca gcc agc acc ccc acc aag aag ctc gcc gta cgc atc gat gtc Asn Pro Ala Ser Thr Pro Thr Lys Lys Leu Ala Val Arg Ile Asp Val | 912 |
| | 290 | 295 300 |
| 45 | agc cag gaa ggg gag aag tcc tct atc gat ctg acg gaa aac gat ctg Ser Gln Glu Gly Glu Lys Ser Ser Ile Asp Leu Thr Glu Asn Asp Leu | 960 |
| | 305 | 310 315 320 |
| 50 | gtg ttc atc acc aac ggc ggc tgc gtg gag aac tcc act atg ggt tcg Val Phe Ile Thr Asn Gly Gly Cys Val Glu Asn Ser Thr Met Gly Ser | 1008 |
| | 325 | 330 335 |
| 55 | cag aat tcg ccc gcc gca tgg aat ccg gat ctg aag cca ggc ggc ggc Gln Asn Ser Pro Ala Ala Trp Asn Pro Asp Leu Lys Pro Gly Gly Gly | 1056 |
| | 340 | 345 350 |
| 60 | tgg gat atg tgg agg cgt atc gcc gaa cag gat ccg agc ttc ggt cat | 1104 |

| | | |
|----|--|-------------|
| | Trp Asp Met Trp Arg Arg Ile Ala Glu Gln Asp Pro Ser Phe Gly His | |
| | 355 | 360 365 |
| 5 | ccg gaa aag ttc tgt tcc gac ccg aac gcc acc aag tgg atg agc gcc Pro Glu Lys Phe Cys Ser Asp Pro Asn Ala Thr Lys Trp Met Ser Ala | 1152 |
| | 370 | 375 380 |
| 10 | act gtt acc act ttg gac gat gag att cct ccg tat att cag aag ata Thr Val Thr Thr Leu Asp Asp Glu Ile Pro Pro Tyr Ile Gln Lys Ile | 1200 |
| | 385 | 390 395 400 |
| 15 | tgc aag cgc gat ccg ttc tcc ggc aag gtc gtc acc ggc ggc atc gtc Cys Lys Arg Asp Pro Phe Ser Gly Lys Val Val Thr Gly Gly Ile Val | 1248 |
| | 405 | 410 415 |
| 20 | act gtg cag gat tct aac tgg ctg atg agc tgg acg ctc aat cgt caa Thr Val Gln Asp Ser Asn Trp Leu Met Ser Trp Thr Leu Asn Arg Gln | 1296 |
| | 420 | 425 430 |
| 25 | cag cag ttc cgc gat cag ccc aag gat cag ctg tgc gta tgg gtc tat Gln Gln Phe Arg Asp Gln Pro Lys Asp Gln Leu Cys Val Trp Val Tyr | 1344 |
| | 435 | 440 445 |
| 30 | ggc ctg ttc ccg gac aag ccg ggc aac tat gtg aag aag ccg atg acc Gly Leu Phe Pro Asp Lys Pro Gly Asn Tyr Val Lys Lys Pro Met Thr | 1392 |
| | 450 | 455 460 |
| 35 | gaa tgc acc ggc gag gag atc tgt gag gag tgg ctc tac cac atg ggc Glu Cys Thr Gly Glu Glu Ile Cys Glu Glu Trp Leu Tyr His Met Gly | 1440 |
| | 465 | 470 475 480 |
| 40 | gta ccg acc gac aag atc gag tcg ctt gcc aaa cat cat gcc aat acc Val Pro Thr Asp Lys Ile Glu Ser Leu Ala Lys His His Ala Asn Thr | 1488 |
| | 485 | 490 495 |
| 45 | gtg ccg gtg atg atg cca tac atc act gca ttc ttc atg cct cgc gca Val Pro Val Met Met Pro Tyr Ile Thr Ala Phe Phe Met Pro Arg Ala | 1536 |
| | 500 | 505 510 |
| 50 | gcc ggc gac cgc ccg gac gtg gtr ccc gat ggc gcc gtg aac ttc gca Ala Gly Asp Arg Pro Asp Val Xaa Pro Asp Gly Ala Val Asn Phe Ala | 1584 |
| | 515 | 520 525 |
| 55 | ttc ctc ggc cag ttc gcc gaa acc cca cgc gat acg atc ttc acc acc Phe Leu Gly Gln Phe Ala Glu Thr Pro Arg Asp Thr Ile Phe Thr Thr | 1632 |
| | 530 | 535 540 |
| 60 | gaa tat tcg atg cgt acc ggt atg gaa gcc gtc tat acg ctg ctc ggg | 1680 |

11/40

Lys Pro Ala Gly Val Asp Ser Lys His Ala Tyr Ile Ile Gly Thr Gly
20 25 30

5 Leu Ala Ala Leu Ser Ser Ala Cys Tyr Leu Val Arg Asp Gly Gln Met
35 40 45

10 Pro Gly Asp His Ile His Ile Leu Glu Lys Asp Pro Val Pro Gly Gly
50 55 60

15 Ala Cys Asp Gly Leu Asp Ile Pro Gly Leu Gly Tyr Val Met Arg Gly
65 70 75 80

Gly Arg Glu Met Asp Asn His Phe Glu Val Met Trp Asp Leu Phe Arg
85 90 95

20 Ser Ile Pro Ser Ile Glu Thr Glu Gly Val Ser Val Leu Asp Glu Tyr
100 105 110

25 Tyr Trp Leu Asn Lys Glu Asp Pro Asn Tyr Ser Leu Cys Arg Ala Thr
115 120 125

30 Lys Asp Leu Gly Lys Asp Ala Gly Leu Lys Gly Lys Phe Gly Leu Ser
130 135 140

35 Asp Lys Ala Ser Met Glu Ile Met Lys Leu Phe Phe Thr Pro Asp Glu
145 150 155 160

40 Asp Leu Tyr Asp Lys Pro Ile Thr Asp Phe Phe Asp Asp Glu Val Leu
165 170 175

Asn Ser Asn Phe Trp Leu Tyr Trp Arg Thr Met Phe Ala Phe Glu Asn
180 185 190

45 Trp His Ser Ala Leu Glu Met Lys Leu Tyr Ile Lys Arg Tyr Ile His
195 200 205

12/40

His Ile Gly Gly Leu Pro Asp Phe Ser Ala Leu Arg Phe Thr Arg Tyr
 210 215 220

5 Asn Gln Tyr Glu Ser Met Ile Leu Pro Met Val Lys Tyr Leu Glu Ser
 225 230 235 240

10 His Gly Val Glu Phe Arg Tyr Asn Thr Lys Val Glu Asn Val Glu Phe
 245 250 255

15 Ala Ile Gly Gly Gly Asp Gly Pro Lys Arg Glu His Thr Gly Val Gly
 260 265 270

20 Gln Asp Thr Ile Gln Lys Ile Gln Ala Thr Ser Gly Phe Phe Lys Arg
 275 280 285

25 Asn Pro Ala Ser Thr Pro Thr Lys Lys Leu Ala Val Arg Ile Asp Val
 290 295 300

30 Ser Gln Glu Gly Glu Lys Ser Ser Ile Asp Leu Thr Glu Asn Asp Leu
 305 310 315 320

35 Val Phe Ile Thr Asn Gly Gly Cys Val Glu Asn Ser Thr Met Gly Ser
 325 330 335

40 Gln Asn Ser Pro Ala Ala Trp Asn Pro Asp Leu Lys Pro Gly Gly Gly
 340 345 350

45 Trp Asp Met Trp Arg Arg Ile Ala Glu Gln Asp Pro Ser Phe Gly His
 355 360 365

50 Pro Glu Lys Phe Cys Ser Asp Pro Asn Ala Thr Lys Trp Met Ser Ala
 370 375 380

55 Thr Val Thr Thr Leu Asp Asp Glu Ile Pro Pro Tyr Ile Gln Lys Ile
 385 390 395 400

Cys Lys Arg Asp Pro Phe Ser Gly Lys Val Val Thr Gly Gly Ile Val
 405 410 415

5 Thr Val Gln Asp Ser Asn Trp Leu Met Ser Trp Thr Leu Asn Arg Gln
 420 425 430

10 Gln Gln Phe Arg Asp Gln Pro Lys Asp Gln Leu Cys Val Trp Val Tyr
 435 440 445

15 Gly Leu Phe Pro Asp Lys Pro Gly Asn Tyr Val Lys Lys Pro Met Thr
 450 455 460

20 Glu Cys Thr Gly Glu Glu Ile Cys Glu Glu Trp Leu Tyr His Met Gly
 465 470 475 480

Val Pro Thr Asp Lys Ile Glu Ser Leu Ala Lys His His Ala Asn Thr
 485 490 495

25 Val Pro Val Met Met Pro Tyr Ile Thr Ala Phe Phe Met Pro Arg Ala
 500 505 510

30 Ala Gly Asp Arg Pro Asp Val Xaa Pro Asp Gly Ala Val Asn Phe Ala
 515 520 525

35 Phe Leu Gly Gln Phe Ala Glu Thr Pro Arg Asp Thr Ile Phe Thr Thr
 530 535 540

40 Glu Tyr Ser Met Arg Thr Gly Met Glu Ala Val Tyr Thr Leu Leu Gly
 545 550 555 560

Val Asp Arg Gly Val Pro Glu Val Trp Gly Ser Val Tyr Asp Val Arg
 565 570 575

45 Asn Leu Leu Asn Ala Thr Val Lys Leu Arg Asp Gly Ala Pro Val Thr
 580 585 590

```

Asp Met Lys Leu Asn Phe Ile Glu Lys Ala Val Val Lys Lys Val Leu
      595                               600                               605

5  Lys Lys Leu Asp Gly Thr Asp Ile Ala Thr Leu Leu Arg Glu Tyr His
      610                               615                               620

Val Ile
10 625

<210> 5

15 <211> 1779

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri
20

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(1779)

<223>
30

<400> 5
atg ggt tac tac tcc aac ggt aac tac gaa gct ttc gct aga cca aag      48
35 Met Gly Tyr Tyr Ser Asn Gly Asn Tyr Glu Ala Phe Ala Arg Pro Lys
   1           5           10           15

aag cca gct ggt gtt gat aag aaa cat gcc tac att gtc ggt ggt ggt      96
40 Lys Pro Ala Gly Val Asp Lys Lys His Ala Tyr Ile Val Gly Gly Gly
      20           25           30

tta gct ggt tta tcg gcc gcc gtg ttt tta att cgt gat gcc caa atg      144
Leu Ala Gly Leu Ser Ala Ala Val Phe Leu Ile Arg Asp Ala Gln Met
      35           40           45

45 ccg ggt gag aat atc cat att tta gag gaa tta ccg gtt gcc ggt ggt      192
Pro Gly Glu Asn Ile His Ile Leu Glu Glu Leu Pro Val Ala Gly Gly
      50           55           60

```

tct ctt gat ggt gaa gat cgt cct gga att ggt ttt gtt act cgt gga 240
Ser Leu Asp Gly Glu Asp Arg Pro Gly Ile Gly Phe Val Thr Arg Gly
65 70 75 80

5
ggc cgg gaa atg gag aac cat ttc gag tgt atg tgg gac atg tat cgt 288
Gly Arg Glu Met Glu Asn His Phe Glu Cys Met Trp Asp Met Tyr Arg
85 90 95

10
tca att cca tca ctt gaa atc cca ggt gct tcc tac ctt gat gaa tac 336
Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ile Pro Gly Ala Ser Tyr Leu Asp Glu Tyr
100 105 110

15
tac tgg tta gat aag gaa gat cca aac agt tct aat tgt cgt tta acc 384
Tyr Trp Leu Asp Lys Glu Asp Pro Asn Ser Ser Asn Cys Arg Leu Thr
115 120 125

20
tat aag cgg gga aat gaa gtt cca tcg gac ggt aaa tat ggt tta agt 432
Tyr Lys Arg Gly Asn Glu Val Pro Ser Asp Gly Lys Tyr Gly Leu Ser
130 135 140

25
aaa aag gca atc aaa gag ctg act aag cta att atg acc cct gaa gaa 480
Lys Lys Ala Ile Lys Glu Leu Thr Lys Leu Ile Met Thr Pro Glu Glu
145 150 155 160

30
aaa ttg gga agg gag act att ggt gaa tac ttc tct gat gat ttc ttt 528
Lys Leu Gly Arg Glu Thr Ile Gly Glu Tyr Phe Ser Asp Asp Phe Phe
165 170 175

35
gaa agc aat ttc tgg att tat tgg tca aca atg ttt gcg ttt gaa cgg 576
Glu Ser Asn Phe Trp Ile Tyr Trp Ser Thr Met Phe Ala Phe Glu Arg
180 185 190

40
tgg cac tct cta gct gaa atg cgt cgt tat atg atg cgg ttt att cac 624
Trp His Ser Leu Ala Glu Met Arg Arg Tyr Met Met Arg Phe Ile His
195 200 205

45
cat att gat ggt tta ccg gat ttc act gca ctg aag ttt aat aag tat 672
His Ile Asp Gly Leu Pro Asp Phe Thr Ala Leu Lys Phe Asn Lys Tyr
210 215 220

50
aac caa tat gaa tca atg acc aag ccg cta ttg gcc tac ctg aaa gat 720
Asn Gln Tyr Glu Ser Met Thr Lys Pro Leu Leu Ala Tyr Leu Lys Asp
225 230 235 240

55
cat cat gtc aag att gag tac gat acc cag gta aag aat gtt att gtt 768
His His Val Lys Ile Glu Tyr Asp Thr Gln Val Lys Asn Val Ile Val
245 250 255

gat act cat ggg cgg caa aag cac gct aag cga atc tta tta act caa 816
Asp Thr His Gly Arg Gln Lys His Ala Lys Arg Ile Leu Leu Thr Gln
260 265 270
5
gcc ggt aaa gat aaa gtt gtt gag tta acg gac aat gac ctt gtc ttt 864
Ala Gly Lys Asp Lys Val Val Glu Leu Thr Asp Asn Asp Leu Val Phe
275 280 285
10
gtc aca aac ggt tca att aca gaa agt tct act tac ggc agt cac cat 912
Val Thr Asn Gly Ser Ile Thr Glu Ser Ser Thr Tyr Gly Ser His His
290 295 300
caa gca gct cga cca acg caa gca ctt ggt ggt agt tgg aaa ctg tgg 960
15
Gln Ala Ala Arg Pro Thr Gln Ala Leu Gly Gly Ser Trp Lys Leu Trp
305 310 315 320
gaa aac ctt gct cgg cag tca gct gat ttt ggt cat cct gat gtc ttt 1008
20
Glu Asn Leu Ala Arg Gln Ser Ala Asp Phe Gly His Pro Asp Val Phe
325 330 335
tgc aag aat ctt cca ggg aga agc tgg ttc att tcc gct act gca acc 1056
25
Cys Lys Asn Leu Pro Gly Arg Ser Trp Phe Ile Ser Ala Thr Ala Thr
340 345 350
gtt aag aac ccg caa gtt gaa cca tac att gaa cgc tta acc aag cga 1104
30
Val Lys Asn Pro Gln Val Glu Pro Tyr Ile Glu Arg Leu Thr Lys Arg
355 360 365
gat ctc cat gat ggc aaa gtt aat act ggt gga atc att acg gtc act 1152
35
Asp Leu His Asp Gly Lys Val Asn Thr Gly Gly Ile Ile Thr Val Thr
370 375 380
gac tct aat tgg atg ctt tcc tgg aca att cac cgt caa ccg cac ttc 1200
40
Asp Ser Asn Trp Met Leu Ser Trp Thr Ile His Arg Gln Pro His Phe
385 390 395 400
aag aaa caa aag aaa aat gaa acc att gtt tgg att tac ggt ctg tac 1248
45
Lys Lys Gln Lys Lys Asn Glu Thr Ile Val Trp Ile Tyr Gly Leu Tyr
405 410 415
tct aat aca aag gga aac tat att aag aaa cgg atc gtt gat tgt act 1296
Ser Asn Thr Lys Gly Asn Tyr Ile Lys Lys Arg Ile Val Asp Cys Thr
420 425 430
ggg gaa gag att act aaa gaa tgg cta tcc atc tgg ggg ttc cag aag 1344
50
Gly Glu Glu Ile Thr Lys Glu Trp Leu Ser Ile Trp Gly Phe Gln Lys
435 440 445

ccg tta att gac gat ttg gct aag gag agt tca att aat act gtt cca 1392
 Pro Leu Ile Asp Asp Leu Ala Lys Glu Ser Ser Ile Asn Thr Val Pro
 450 455 460

5

gta tat atg cca ttt atc act agc tac ttt atg cca cga gtt aag ggc 1440
 Val Tyr Met Pro Phe Ile Thr Ser Tyr Phe Met Pro Arg Val Lys Gly
 465 470 475 480

10

gac cgt cca gac gtt gtt cca gaa gga tcc gct aac ttg gca ttt att 1488
 Asp Arg Pro Asp Val Val Pro Glu Gly Ser Ala Asn Leu Ala Phe Ile
 485 490 495

15

ggt aac ttt gct gaa tct cca agt cga gat acc gta ttt acc acg gaa 1536
 Gly Asn Phe Ala Glu Ser Pro Ser Arg Asp Thr Val Phe Thr Thr Glu
 500 505 510

20

tat tca gta cgg acc gca atg gaa gcc gtc tac act cta tta gat gtt 1584
 Tyr Ser Val Arg Thr Ala Met Glu Ala Val Tyr Thr Leu Leu Asp Val
 515 520 525

25

gat cgg gga gtt cca gaa gtc ttt aac tct att tat gat ctt cga gag 1632
 Asp Arg Gly Val Pro Glu Val Phe Asn Ser Ile Tyr Asp Leu Arg Glu
 530 535 540

30

tta atg cgg gca atg tat tac atg aat gat aag aag ccg tta aaa gac 1680
 Leu Met Arg Ala Met Tyr Tyr Met Asn Asp Lys Lys Pro Leu Lys Asp
 545 550 555 560

35

atg gac ttg cca att cca aag att gtt gaa aag cca tta tta aag aaa 1728
 Met Asp Leu Pro Ile Pro Lys Ile Val Glu Lys Pro Leu Leu Lys Lys
 565 570 575

ctc caa gga acg tgg att ggt gaa tta atg gag caa cag cac tta cta 1776
 Leu Gln Gly Thr Trp Ile Gly Glu Leu Met Glu Gln Gln His Leu Leu
 580 585 590

40

taa 1779

<210> 6

<211> 592

45

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 6

5 Met Gly Tyr Tyr Ser Asn Gly Asn Tyr Glu Ala Phe Ala Arg Pro Lys
 1 5 10 15

10 Lys Pro Ala Gly Val Asp Lys Lys His Ala Tyr Ile Val Gly Gly Gly
 20 25 30

15 Leu Ala Gly Leu Ser Ala Ala Val Phe Leu Ile Arg Asp Ala Gln Met
 35 40 45

20 Pro Gly Glu Asn Ile His Ile Leu Glu Glu Leu Pro Val Ala Gly Gly
 50 55 60

25 Ser Leu Asp Gly Glu Asp Arg Pro Gly Ile Gly Phe Val Thr Arg Gly
 65 70 75 80

30 Gly Arg Glu Met Glu Asn His Phe Glu Cys Met Trp Asp Met Tyr Arg
 85 90 95

35 Ser Ile Pro Ser Leu Glu Ile Pro Gly Ala Ser Tyr Leu Asp Glu Tyr
 100 105 110

40 Tyr Trp Leu Asp Lys Glu Asp Pro Asn Ser Ser Asn Cys Arg Leu Thr
 115 120 125

45 Tyr Lys Arg Gly Asn Glu Val Pro Ser Asp Gly Lys Tyr Gly Leu Ser
 130 135 140

50 Lys Lys Ala Ile Lys Glu Leu Thr Lys Leu Ile Met Thr Pro Glu Glu
 145 150 155 160

55 Lys Leu Gly Arg Glu Thr Ile Gly Glu Tyr Phe Ser Asp Asp Phe Phe
 165 170 175

19/40

Glu Ser Asn Phe Trp Ile Tyr Trp Ser Thr Met Phe Ala Phe Glu Arg
 180 185 190

5 Trp His Ser Leu Ala Glu Met Arg Arg Tyr Met Met Arg Phe Ile His
 195 200 205

10 His Ile Asp Gly Leu Pro Asp Phe Thr Ala Leu Lys Phe Asn Lys Tyr
 210 215 220

15 Asn Gln Tyr Glu Ser Met Thr Lys Pro Leu Leu Ala Tyr Leu Lys Asp
 225 230 235 240

20 His His Val Lys Ile Glu Tyr Asp Thr Gln Val Lys Asn Val Ile Val
 245 250 255

Asp Thr His Gly Arg Gln Lys His Ala Lys Arg Ile Leu Leu Thr Gln
 260 265 270

25 Ala Gly Lys Asp Lys Val Val Glu Leu Thr Asp Asn Asp Leu Val Phe
 275 280 285

30 Val Thr Asn Gly Ser Ile Thr Glu Ser Ser Thr Tyr Gly Ser His His
 290 295 300

35 Gln Ala Ala Arg Pro Thr Gln Ala Leu Gly Gly Ser Trp Lys Leu Trp
 305 310 315 320

Glu Asn Leu Ala Arg Gln Ser Ala Asp Phe Gly His Pro Asp Val Phe
 325 330 335

40 Cys Lys Asn Leu Pro Gly Arg Ser Trp Phe Ile Ser Ala Thr Ala Thr
 340 345 350

45 Val Lys Asn Pro Gln Val Glu Pro Tyr Ile Glu Arg Leu Thr Lys Arg
 355 360 365

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Asp | Leu | His | Asp | Gly | Lys | Val | Asn | Thr | Gly | Gly | Ile | Ile | Thr | Val | Thr |
| | 370 | | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| 5 | Asp | Ser | Asn | Trp | Met | Leu | Ser | Trp | Thr | Ile | His | Arg | Gln | Pro | His | Phe |
| | 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 |
| 10 | Lys | Lys | Gln | Lys | Lys | Asn | Glu | Thr | Ile | Val | Trp | Ile | Tyr | Gly | Leu | Tyr |
| | | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | | 415 |
| 15 | Ser | Asn | Thr | Lys | Gly | Asn | Tyr | Ile | Lys | Lys | Arg | Ile | Val | Asp | Cys | Thr |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| 20 | Gly | Glu | Glu | Ile | Thr | Lys | Glu | Trp | Leu | Ser | Ile | Trp | Gly | Phe | Gln | Lys |
| | | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | |
| 25 | Pro | Leu | Ile | Asp | Asp | Leu | Ala | Lys | Glu | Ser | Ser | Ile | Asn | Thr | Val | Pro |
| | 450 | | | | | | 455 | | | | | | 460 | | | |
| 30 | Val | Tyr | Met | Pro | Phe | Ile | Thr | Ser | Tyr | Phe | Met | Pro | Arg | Val | Lys | Gly |
| | 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 |
| 35 | Asp | Arg | Pro | Asp | Val | Val | Pro | Glu | Gly | Ser | Ala | Asn | Leu | Ala | Phe | Ile |
| | | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | |
| 40 | Gly | Asn | Phe | Ala | Glu | Ser | Pro | Ser | Arg | Asp | Thr | Val | Phe | Thr | Thr | Glu |
| | | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | |
| 45 | Tyr | Ser | Val | Arg | Thr | Ala | Met | Glu | Ala | Val | Tyr | Thr | Leu | Leu | Asp | Val |
| | | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | |
| 50 | Asp | Arg | Gly | Val | Pro | Glu | Val | Phe | Asn | Ser | Ile | Tyr | Asp | Leu | Arg | Glu |
| | 530 | | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | |
| 55 | Leu | Met | Arg | Ala | Met | Tyr | Tyr | Met | Asn | Asp | Lys | Lys | Pro | Leu | Lys | Asp |
| | 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 |

Met Asp Leu Pro Ile Pro Lys Ile Val Glu Lys Pro Leu Leu Lys Lys
 565 570 575

5 Leu Gln Gly Thr Trp Ile Gly Glu Leu Met Glu Gln Gln His Leu Leu
 580 585 590

10 <210> 7

<211> 1275

<212> DNA

15 <213> Propionibacterium acnes

<220>

20 <221> CDS

<222> (1)..(1275)

25 <223>

<400> 7

30 atg tcc atc tcg aag gat tca cgt atc gcc atc atc ggg gct ggc ccg 48
 Met Ser Ile Ser Lys Asp Ser Arg Ile Ala Ile Ile Gly Ala Gly Pro
 1 5 10 15

35 gcc ggg ctg gct gcc gga atg tac ctc gaa cag gcc gga ttt cac gac 96
 Ala Gly Leu Ala Ala Gly Met Tyr Leu Glu Gln Ala Gly Phe His Asp
 20 25 30

40 tac acg atc ctg gaa cgc acc gac cac gtc gga ggc aag tgc cac tca 144
 Tyr Thr Ile Leu Glu Arg Thr Asp His Val Gly Gly Lys Cys His Ser
 35 40 45

45 ccg aac tac cac ggc cgt cgt tat gag atg ggg gcc atc atg ggc gtc 192
 Pro Asn Tyr His Gly Arg Arg Tyr Glu Met Gly Ala Ile Met Gly Val
 50 55 60

ccc agt tac gac acc atc cag gag atc atg gat cgc act ggc gac aag 240
 Pro Ser Tyr Asp Thr Ile Gln Glu Ile Met Asp Arg Thr Gly Asp Lys
 65 70 75 80

| | | |
|----|---|-----|
| | gtc gac ggg ccg aaa ctg cgt cgc gag ttc ctg cac gag gac ggc gag | 288 |
| | Val Asp Gly Pro Lys Leu Arg Arg Glu Phe Leu His Glu Asp Gly Glu | |
| | 85 90 95 | |
| 5 | atc tac gtc ccg gaa aag gat cca gtg cgt ggt ccg cag gtc atg gca | 336 |
| | Ile Tyr Val Pro Glu Lys Asp Pro Val Arg Gly Pro Gln Val Met Ala | |
| | 100 105 110 | |
| 10 | gca gtg cag aag ctg ggc cag ttg ctc gcg acg aag tac cag gga tat | 384 |
| | Ala Val Gln Lys Leu Gly Gln Leu Leu Ala Thr Lys Tyr Gln Gly Tyr | |
| | 115 120 125 | |
| 15 | gac gcc aac ggc cac tac aac aag gtt cac gag gac ctc atg ctg ccc | 432 |
| | Asp Ala Asn Gly His Tyr Asn Lys Val His Glu Asp Leu Met Leu Pro | |
| | 130 135 140 | |
| 20 | ttc gac gag ttc ctc gcc ctc aac ggg tgc gag gcc gcc cga gac ctg | 480 |
| | Phe Asp Glu Phe Leu Ala Leu Asn Gly Cys Glu Ala Ala Arg Asp Leu | |
| | 145 150 155 160 | |
| 25 | tgg atc aac ccc ttc acg gcc ttc ggc tac ggg cac ttc gac aac gtc | 528 |
| | Trp Ile Asn Pro Phe Thr Ala Phe Gly Tyr Gly His Phe Asp Asn Val | |
| | 165 170 175 | |
| 30 | ccg gcc gcc tac gtg ctg aag tac ctc gac ttc gtc acc atg atg tcc | 576 |
| | Pro Ala Ala Tyr Val Leu Lys Tyr Leu Asp Phe Val Thr Met Met Ser | |
| | 180 185 190 | |
| 35 | ttt gcc aag gga gat ctg tgg acg tgg gcc gac ggc acc cag gcg atg | 624 |
| | Phe Ala Lys Gly Asp Leu Trp Thr Trp Ala Asp Gly Thr Gln Ala Met | |
| | 195 200 205 | |
| 40 | ttc gag cac ctc aac gcc acc ctg gag cac ccg gcc gaa cgc aac gtt | 672 |
| | Phe Glu His Leu Asn Ala Thr Leu Glu His Pro Ala Glu Arg Asn Val | |
| | 210 215 220 | |
| 45 | gac atc act cgc atc acc cgc gag gac ggc aag gtc cac att cac acc | 720 |
| | Asp Ile Thr Arg Ile Thr Arg Glu Asp Gly Lys Val His Ile His Thr | |
| | 225 230 235 240 | |
| 50 | acg gac tgg gat cgc gag tcc gac gtc ctc gtc ctc acc gtc ccg ctg | 768 |
| | Thr Asp Trp Asp Arg Glu Ser Asp Val Leu Val Leu Thr Val Pro Leu | |
| | 245 250 255 | |
| 55 | gaa aag ttc ctc gac tac tcc gac gcg gac gat gac gag cgg gag tac | 816 |
| | Glu Lys Phe Leu Asp Tyr Ser Asp Ala Asp Asp Asp Glu Arg Glu Tyr | |
| | 260 265 270 | |

| | | |
|----|---|------|
| | ttc tcg aag atc atc cac cag cag tac atg gtg gat gcc tgc ctg gtg | 864 |
| | Phe Ser Lys Ile Ile His Gln Gln Tyr Met Val Asp Ala Cys Leu Val | |
| | 275 280 285 | |
| 5 | aag gag tac ccg acc atc tcc ggg tac gtc ccc gac aac atg agg ccc | 912 |
| | Lys Glu Tyr Pro Thr Ile Ser Gly Tyr Val Pro Asp Asn Met Arg Pro | |
| | 290 295 300 | |
| 10 | gaa cgt ctc ggg cac gtc atg gtt tac tac cac cgc tgg gct gat gat | 960 |
| | Glu Arg Leu Gly His Val Met Val Tyr Tyr His Arg Trp Ala Asp Asp | |
| | 305 310 315 320 | |
| 15 | ccg cac cag atc atc acg acc tac ctg cta cgt aac cat ccg gac tac | 1008 |
| | Pro His Gln Ile Ile Thr Thr Tyr Leu Leu Arg Asn His Pro Asp Tyr | |
| | 325 330 335 | |
| 20 | gcg gac aag act cag gag gag tgc cgc cag atg gtc ctc gac gac atg | 1056 |
| | Ala Asp Lys Thr Gln Glu Glu Cys Arg Gln Met Val Leu Asp Asp Met | |
| | 340 345 350 | |
| 25 | gag acc ttc ggt cat ccg gtc gag aag atc atc gag gag cag acc tgg | 1104 |
| | Glu Thr Phe Gly His Pro Val Glu Lys Ile Ile Glu Glu Gln Thr Trp | |
| | 355 360 365 | |
| 30 | tac tac ttc ccg cac gtt agc tcg gag gac tac aag gcc ggg tgg tac | 1152 |
| | Tyr Tyr Phe Pro His Val Ser Ser Glu Asp Tyr Lys Ala Gly Trp Tyr | |
| | 370 375 380 | |
| 35 | gag aag gtc gag gga atg cag ggt cgt cgc aac acc ttc tac gcc gga | 1200 |
| | Glu Lys Val Glu Gly Met Gln Gly Arg Arg Asn Thr Phe Tyr Ala Gly | |
| | 385 390 395 400 | |
| 40 | gaa att atg agt ttc ggt aat ttc gac gag gtg tgc cac tac tcg aag | 1248 |
| | Glu Ile Met Ser Phe Gly Asn Phe Asp Glu Val Cys His Tyr Ser Lys | |
| | 405 410 415 | |
| 45 | gac ctg gtg acg cgg ttc ttc gtg tga | 1275 |
| | Asp Leu Val Thr Arg Phe Phe Val | |
| | 420 | |
| | <210> 8 | |
| | <211> 424 | |
| | <212> PRT | |

<213> Propionibacterium acnes

5 <400> 8

Met Ser Ile Ser Lys Asp Ser Arg Ile Ala Ile Ile Gly Ala Gly Pro
 1 5 10 15

10

Ala Gly Leu Ala Ala Gly Met Tyr Leu Glu Gln Ala Gly Phe His Asp
 20 25 30

15

Tyr Thr Ile Leu Glu Arg Thr Asp His Val Gly Gly Lys Cys His Ser
 35 40 45

20

Pro Asn Tyr His Gly Arg Arg Tyr Glu Met Gly Ala Ile Met Gly Val
 50 55 60

25

Pro Ser Tyr Asp Thr Ile Gln Glu Ile Met Asp Arg Thr Gly Asp Lys
 65 70 75 80

30

Val Asp Gly Pro Lys Leu Arg Arg Glu Phe Leu His Glu Asp Gly Glu
 85 90 95

Ile Tyr Val Pro Glu Lys Asp Pro Val Arg Gly Pro Gln Val Met Ala
 100 105 110

35

Ala Val Gln Lys Leu Gly Gln Leu Leu Ala Thr Lys Tyr Gln Gly Tyr
 115 120 125

40

Asp Ala Asn Gly His Tyr Asn Lys Val His Glu Asp Leu Met Leu Pro
 130 135 140

45

Phe Asp Glu Phe Leu Ala Leu Asn Gly Cys Glu Ala Ala Arg Asp Leu
 145 150 155 160

Trp Ile Asn Pro Phe Thr Ala Phe Gly Tyr Gly His Phe Asp Asn Val
 165 170 175

Pro Ala Ala Tyr Val Leu Lys Tyr Leu Asp Phe Val Thr Met Met Ser
 180 185 190
 5

Phe Ala Lys Gly Asp Leu Trp Thr Trp Ala Asp Gly Thr Gln Ala Met
 195 200 205
 10

Phe Glu His Leu Asn Ala Thr Leu Glu His Pro Ala Glu Arg Asn Val
 210 215 220
 15

Asp Ile Thr Arg Ile Thr Arg Glu Asp Gly Lys Val His Ile His Thr
 225 230 235 240
 20

Thr Asp Trp Asp Arg Glu Ser Asp Val Leu Val Leu Thr Val Pro Leu
 245 250 255
 25

Glu Lys Phe Leu Asp Tyr Ser Asp Ala Asp Asp Asp Glu Arg Glu Tyr
 260 265 270
 30

Phe Ser Lys Ile Ile His Gln Gln Tyr Met Val Asp Ala Cys Leu Val
 275 280 285
 35

Lys Glu Tyr Pro Thr Ile Ser Gly Tyr Val Pro Asp Asn Met Arg Pro
 290 295 300
 40

Glu Arg Leu Gly His Val Met Val Tyr Tyr His Arg Trp Ala Asp Asp
 305 310 315 320
 45

Pro His Gln Ile Ile Thr Thr Tyr Leu Leu Arg Asn His Pro Asp Tyr
 325 330 335
 50

Ala Asp Lys Thr Gln Glu Glu Cys Arg Gln Met Val Leu Asp Asp Met
 340 345 350
 55

Glu Thr Phe Gly His Pro Val Glu Lys Ile Ile Glu Glu Gln Thr Trp
 355 360 365
 60

Tyr Tyr Phe Pro His Val Ser Ser Glu Asp Tyr Lys Ala Gly Trp Tyr
 370 375 380
 5

Glu Lys Val Glu Gly Met Gln Gly Arg Arg Asn Thr Phe Tyr Ala Gly
 385 390 395 400

10

Glu Ile Met Ser Phe Gly Asn Phe Asp Glu Val Cys His Tyr Ser Lys
 405 410 415

15 Asp Leu Val Thr Arg Phe Phe Val
 420

<210> 9
 20

<211> 1878
 <212> DNA

25 <213> Bifidobacterium breve

<220>
 30

<221> CDS
 <222> (1)..(1878)

35 <223>

<400> 9

40 atg tac tac agc agc ggc aac tat gag gcg ttt gcc cgt ccg aag aag 48
 Met Tyr Tyr Ser Ser Gly Asn Tyr Glu Ala Phe Ala Arg Pro Lys Lys
 1 5 10 15

cca gcc ggc gta gac agc aag cat gca tat atc atc ggc acc ggt ctg 96
 45 Pro Ala Gly Val Asp Ser Lys His Ala Tyr Ile Ile Gly Thr Gly Leu
 20 25 30

gcg gcc ttg tct tcg gcc tgt tac ctg gtg cgt gac ggc cag atg cca 144

| | | |
|----|--|-----|
| | Ala Ala Leu Ser Ser Ala Cys Tyr Leu Val Arg Asp Gly Gln Met Pro | |
| | 35 40 45 | |
| 5 | ggc gat cat att cat att ctc gaa aag gat ccc gta ccg gga gga gcc Gly Asp His Ile His Ile Leu Glu Lys Asp Pro Val Pro Gly Gly Ala | 192 |
| | 50 55 60 | |
| 10 | tgc gat ggt ctc gat att cct ggt ctc ggt tat gtg atg cgc ggc ggc Cys Asp Gly Leu Asp Ile Pro Gly Leu Gly Tyr Val Met Arg Gly Gly | 240 |
| | 65 70 75 80 | |
| 15 | cgc gaa atg gac aat cat ttc gag gtc atg tgg gat ctc ttc cgt tcg Arg Glu Met Asp Asn His Phe Glu Val Met Trp Asp Leu Phe Arg Ser | 288 |
| | 85 90 95 | |
| 20 | att ccc tcc atc gag acc gag gga gtc agc gtg ctc gac gaa tac tat Ile Pro Ser Ile Glu Thr Glu Gly Val Ser Val Leu Asp Glu Tyr Tyr | 336 |
| | 100 105 110 | |
| 25 | tgg ctc aac aag gaa gat ccg aat tac tcg cta tgc cgc gcc acc aaa Trp Leu Asn Lys Glu Asp Pro Asn Tyr Ser Leu Cys Arg Ala Thr Lys | 384 |
| | 115 120 125 | |
| 30 | gat ctc ggc aag gat gcc gga ctc aag ggc aaa ttc gga ttg tct gac Asp Leu Gly Lys Asp Ala Gly Leu Lys Gly Lys Phe Gly Leu Ser Asp | 432 |
| | 130 135 140 | |
| 35 | aag gct tcc atg gaa atc atg aag ctg ttc ttc act ccg gac gag gac Lys Ala Ser Met Glu Ile Met Lys Leu Phe Phe Thr Pro Asp Glu Asp | 480 |
| | 145 150 155 160 | |
| 40 | ctg tat gac aag ccg atc acc gat ttc ttc gat gac gag gtg ctg aac Leu Tyr Asp Lys Pro Ile Thr Asp Phe Phe Asp Asp Glu Val Leu Asn | 528 |
| | 165 170 175 | |
| 45 | tcc aac ttc tgg ctg tac tgg cgt acc atg ttc gct ttt gaa aat tgg Ser Asn Phe Trp Leu Tyr Trp Arg Thr Met Phe Ala Phe Glu Asn Trp | 576 |
| | 180 185 190 | |
| 50 | cat tca gcg ttg gaa atg aag ctg tac atc aag cgc tac att cat cac His Ser Ala Leu Glu Met Lys Leu Tyr Ile Lys Arg Tyr Ile His His | 624 |
| | 195 200 205 | |
| 55 | atc ggc ggc ttg ccg gac ttc tcc gca ctg cga ttc acc cgc tac aac Ile Gly Gly Leu Pro Asp Phe Ser Ala Leu Arg Phe Thr Arg Tyr Asn | 672 |
| | 210 215 220 | |
| 60 | cag tac gag tcg atg att ttg ccc atg gtc aaa tat ctg gaa tct cat | 720 |

| | | |
|----|--|-------------|
| | Gln Tyr Glu Ser Met Ile Leu Pro Met Val Lys Tyr Leu Glu Ser His | |
| | 225 | 230 235 240 |
| 5 | ggc gtg gaa ttc cga tac aac acc aag gtc gag aac gtc gaa ttc gcc Gly Val Glu Phe Arg Tyr Asn Thr Lys Val Glu Asn Val Glu Phe Ala | 768 |
| | 245 | 250 255 |
| 10 | atc ggt ggg gga gac ggc ccc aag cgc gag cat act ggc gtc gga caa Ile Gly Gly Gly Asp Gly Pro Lys Arg Glu His Thr Gly Val Gly Gln | 816 |
| | 260 | 265 270 |
| 15 | gac acc atc cag aaa atc cag gcc act tcc ggt ttc ttc aag cgc aat Asp Thr Ile Gln Lys Ile Gln Ala Thr Ser Gly Phe Phe Lys Arg Asn | 864 |
| | 275 | 280 285 |
| 20 | cca gcc agc acc ccc acc aag aag ctc gcc gta cgc atc gat gtc agc Pro Ala Ser Thr Pro Thr Lys Lys Leu Ala Val Arg Ile Asp Val Ser | 912 |
| | 290 | 295 300 |
| 25 | cag gaa ggg gag aag tcc tct atc gat ctg acg gaa aac gat ctg gtg Gln Glu Gly Glu Lys Ser Ser Ile Asp Leu Thr Glu Asn Asp Leu Val | 960 |
| | 305 | 310 315 320 |
| 30 | ttc atc acc aac ggc ggc tgc gtg gag aac tcc act atg ggt tcg cag Phe Ile Thr Asn Gly Gly Cys Val Glu Asn Ser Thr Met Gly Ser Gln | 1008 |
| | 325 | 330 335 |
| 35 | aat tcg ccc gcc gca tgg aat ccg gat ctg aag cca ggc ggc ggc tgg Asn Ser Pro Ala Ala Trp Asn Pro Asp Leu Lys Pro Gly Gly Gly Trp | 1056 |
| | 340 | 345 350 |
| 40 | gat atg tgg agg cgt atc gcc gaa cag gat ccg agc ttc ggt cat ccg Asp Met Trp Arg Arg Ile Ala Glu Gln Asp Pro Ser Phe Gly His Pro | 1104 |
| | 355 | 360 365 |
| 45 | gaa aag ttc tgt tcc gac ccg aac gcc acc aag tgg atg agc gcc act Glu Lys Phe Cys Ser Asp Pro Asn Ala Thr Lys Trp Met Ser Ala Thr | 1152 |
| | 370 | 375 380 |
| 50 | ggt acc act ttg gac gat gag att cct ccg tat att cag aag ata tgc Val Thr Thr Leu Asp Asp Glu Ile Pro Pro Tyr Ile Gln Lys Ile Cys | 1200 |
| | 385 | 390 395 400 |
| 55 | aag cgc gat ccg ttc tcc ggc aag gtc gtc acc ggc ggc atc gtc act Lys Arg Asp Pro Phe Ser Gly Lys Val Val Thr Gly Gly Ile Val Thr | 1248 |
| | 405 | 410 415 |
| 60 | gtg cag gat tct aac tgg ctg atg agc tgg acg ctc aat cgt caa cag | 1296 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | Val | Gln | Asp | Ser | Asn | Trp | Leu | Met | Ser | Trp | Thr | Leu | Asn | Arg | Gln | Gln | |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | |
| 5 | cag | ttc | cgc | gat | cag | ccc | aag | gat | cag | ctg | tgc | gta | tgg | gtc | tat | ggc | 1344 |
| | Gln | Phe | Arg | Asp | Gln | Pro | Lys | Asp | Gln | Leu | Cys | Val | Trp | Val | Tyr | Gly | |
| | | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | |
| 10 | ctg | ttc | ccg | gac | aag | ccg | ggc | aac | tat | gtg | aag | aag | ccg | atg | acc | gaa | 1392 |
| | Leu | Phe | Pro | Asp | Lys | Pro | Gly | Asn | Tyr | Val | Lys | Lys | Pro | Met | Thr | Glu | |
| | | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | |
| 15 | tgc | acc | ggc | gag | gag | atc | tgt | gag | gag | tgg | ctc | tac | cac | atg | ggc | gta | 1440 |
| | Cys | Thr | Gly | Glu | Glu | Ile | Cys | Glu | Glu | Trp | Leu | Tyr | His | Met | Gly | Val | |
| | 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 | |
| 20 | ccg | acc | gac | aag | atc | gag | tcg | ctt | gcc | aaa | cat | cat | gcc | aat | acc | gtg | 1488 |
| | Pro | Thr | Asp | Lys | Ile | Glu | Ser | Leu | Ala | Lys | His | His | Ala | Asn | Thr | Val | |
| | | | | 485 | | | | | | 490 | | | | | 495 | | |
| 25 | ccg | gtg | atg | atg | cca | tac | atc | act | gca | ttc | ttc | atg | cct | cgc | gca | gcc | 1536 |
| | Pro | Val | Met | Met | Pro | Tyr | Ile | Thr | Ala | Phe | Phe | Met | Pro | Arg | Ala | Ala | |
| | | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | |
| 30 | ggc | gac | cgc | ccg | gac | gtg | gtr | ccc | gat | ggc | gcc | gtg | aac | ttc | gca | ttc | 1584 |
| | Gly | Asp | Arg | Pro | Asp | Val | Xaa | Pro | Asp | Gly | Ala | Val | Asn | Phe | Ala | Phe | |
| | | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | | |
| 35 | ctc | ggc | cag | ttc | gcc | gaa | acc | cca | cgc | gat | acg | atc | ttc | acc | acc | gaa | 1632 |
| | Leu | Gly | Gln | Phe | Ala | Glu | Thr | Pro | Arg | Asp | Thr | Ile | Phe | Thr | Thr | Glu | |
| | | 530 | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | | |
| 40 | tat | tcg | atg | cgt | acc | ggg | atg | gaa | gcc | gtc | tat | acg | ctg | ctc | ggg | gtg | 1680 |
| | Tyr | Ser | Met | Arg | Thr | Gly | Met | Glu | Ala | Val | Tyr | Thr | Leu | Leu | Gly | Val | |
| | 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 | |
| 45 | gat | cgt | ggc | gtg | ccc | gag | gtg | tgg | ggc | agc | gtc | tat | gac | gtg | cgc | aac | 1728 |
| | Asp | Arg | Gly | Val | Pro | Glu | Val | Trp | Gly | Ser | Val | Tyr | Asp | Val | Arg | Asn | |
| | | | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | | |
| 50 | ctg | ctc | aac | gcc | acc | gtc | aaa | ctg | cgt | gac | ggc | gca | ccg | gtg | acg | gat | 1776 |
| | Leu | Leu | Asn | Ala | Thr | Val | Lys | Leu | Arg | Asp | Gly | Ala | Pro | Val | Thr | Asp | |
| | | | | 580 | | | | | | 585 | | | | 590 | | | |
| 55 | atg | aag | ctc | aac | ttc | att | gaa | aag | gcc | gtg | gtc | aag | aag | gtg | ctt | aag | 1824 |
| | Met | Lys | Leu | Asn | Phe | Ile | Glu | Lys | Ala | Val | Val | Lys | Lys | Val | Leu | Lys | |
| | | | 595 | | | | | | 600 | | | | 605 | | | | |
| 60 | aag | ctc | gat | ggc | acg | gat | att | gct | acc | ctg | cta | cgc | gaa | tac | cat | gtg | 1872 |

Lys Leu Asp Gly Thr Asp Ile Ala Thr Leu Leu Arg Glu Tyr His Val
 610 615 620

atc tga 1878

5 Ile
 625

<210> 10

10 <211> 625

<212> PRT

15 <213> Bifidobacterium breve

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (519)..(519)

25 <223> The 'Xaa' at location 519 stands for Val.

<400> 10

Met Tyr Tyr Ser Ser Gly Asn Tyr Glu Ala Phe Ala Arg Pro Lys Lys
 30 1 5 10 15

Pro Ala Gly Val Asp Ser Lys His Ala Tyr Ile Ile Gly Thr Gly Leu
 20 25 30

35 Ala Ala Leu Ser Ser Ala Cys Tyr Leu Val Arg Asp Gly Gln Met Pro
 35 40 45

40 Gly Asp His Ile His Ile Leu Glu Lys Asp Pro Val Pro Gly Gly Ala
 50 55 60

45 Cys Asp Gly Leu Asp Ile Pro Gly Leu Gly Tyr Val Met Arg Gly Gly
 65 70 75 80

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

Asp Thr Ile Gln Lys Ile Gln Ala Thr Ser Gly Phe Phe Lys Arg Asn
 275 280 285

5 Pro Ala Ser Thr Pro Thr Lys Lys Leu Ala Val Arg Ile Asp Val Ser
 290 295 300

Gln Glu Gly Glu Lys Ser Ser Ile Asp Leu Thr Glu Asn Asp Leu Val
 10 305 310 315 320

Phe Ile Thr Asn Gly Gly Cys Val Glu Asn Ser Thr Met Gly Ser Gln
 15 325 330 335

Asn Ser Pro Ala Ala Trp Asn Pro Asp Leu Lys Pro Gly Gly Gly Trp
 20 340 345 350

Asp Met Trp Arg Arg Ile Ala Glu Gln Asp Pro Ser Phe Gly His Pro
 25 355 360 365

Glu Lys Phe Cys Ser Asp Pro Asn Ala Thr Lys Trp Met Ser Ala Thr
 30 370 375 380

Val Thr Thr Leu Asp Asp Glu Ile Pro Pro Tyr Ile Gln Lys Ile Cys
 35 385 390 395 400

Lys Arg Asp Pro Phe Ser Gly Lys Val Val Thr Gly Gly Ile Val Thr
 40 405 410 415

Val Gln Asp Ser Asn Trp Leu Met Ser Trp Thr Leu Asn Arg Gln Gln
 45 420 425 430

Gln Phe Arg Asp Gln Pro Lys Asp Gln Leu Cys Val Trp Val Tyr Gly
 46 435 440 445

Leu Phe Pro Asp Lys Pro Gly Asn Tyr Val Lys Lys Pro Met Thr Glu
 47 450 455 460

Cys Thr Gly Glu Glu Ile Cys Glu Glu Trp Leu Tyr His Met Gly Val
 465 470 475 480

5 Pro Thr Asp Lys Ile Glu Ser Leu Ala Lys His His Ala Asn Thr Val
 485 490 495

10 Pro Val Met Met Pro Tyr Ile Thr Ala Phe Phe Met Pro Arg Ala Ala
 500 505 510

15 Gly Asp Arg Pro Asp Val Xaa Pro Asp Gly Ala Val Asn Phe Ala Phe
 515 520 525

20 Leu Gly Gln Phe Ala Glu Thr Pro Arg Asp Thr Ile Phe Thr Thr Glu
 530 535 540

Tyr Ser Met Arg Thr Gly Met Glu Ala Val Tyr Thr Leu Leu Gly Val
 545 550 555 560

25 Asp Arg Gly Val Pro Glu Val Trp Gly Ser Val Tyr Asp Val Arg Asn
 565 570 575

30 Leu Leu Asn Ala Thr Val Lys Leu Arg Asp Gly Ala Pro Val Thr Asp
 580 585 590

35 Met Lys Leu Asn Phe Ile Glu Lys Ala Val Val Lys Lys Val Leu Lys
 595 600 605

40 Lys Leu Asp Gly Thr Asp Ile Ala Thr Leu Leu Arg Glu Tyr His Val
 610 615 620

45 Ile
 625

<210> 11
 <211> 1776

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

5

<220>

<221> CDS

10

<222> (1)..(1776)

<223>

15

<400> 11

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| | atg | tat | tat | tca | aac | ggg | aat | tat | gaa | gcc | ttt | gct | cga | cca | aag | aag | 48 |
| | Met | Tyr | Tyr | Ser | Asn | Gly | Asn | Tyr | Glu | Ala | Phe | Ala | Arg | Pro | Lys | Lys | |
| 20 | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| | cct | gct | ggc | ggt | gat | aag | aaa | cat | gcc | tac | att | gtc | ggt | ggt | ggt | tta | 96 |
| | Pro | Ala | Gly | Val | Asp | Lys | Lys | His | Ala | Tyr | Ile | Val | Gly | Gly | Gly | Leu | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |

25

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | gct | ggt | tta | tcg | gcc | gcc | gtg | ttt | tta | att | cgt | gat | gcc | caa | atg | ccg | 144 |
| | Ala | Gly | Leu | Ser | Ala | Ala | Val | Phe | Leu | Ile | Arg | Asp | Ala | Gln | Met | Pro | |
| | | | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 30 | ggt | gag | aat | atc | cat | att | tta | gag | gaa | tta | ccg | ggt | gcc | ggt | ggt | tct | 192 |
| | Gly | Glu | Asn | Ile | His | Ile | Leu | Glu | Glu | Leu | Pro | Val | Ala | Gly | Gly | Ser | |
| | | | 50 | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 35 | ctt | gat | ggt | gaa | gat | cgt | cct | gga | att | ggt | ttt | ggt | act | cgt | gga | ggc | 240 |
| | Leu | Asp | Gly | Glu | Asp | Arg | Pro | Gly | Ile | Gly | Phe | Val | Thr | Arg | Gly | Gly | |
| | | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 40 | cgg | gaa | atg | gag | aac | cat | ttc | gag | tgt | atg | tgg | gac | atg | tat | cgt | tca | 288 |
| | Arg | Glu | Met | Glu | Asn | His | Phe | Glu | Cys | Met | Trp | Asp | Met | Tyr | Arg | Ser | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | att | cca | tca | ctt | gaa | atc | cca | ggt | gct | tcc | tac | ctt | gat | gaa | tac | tac | 336 |
| | Ile | Pro | Ser | Leu | Glu | Ile | Pro | Gly | Ala | Ser | Tyr | Leu | Asp | Glu | Tyr | Tyr | |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |

45

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | tgg | tta | gat | aag | gaa | gat | cca | aac | agt | tct | aat | tgt | cgt | tta | acc | tat | 384 |
| | Trp | Leu | Asp | Lys | Glu | Asp | Pro | Asn | Ser | Ser | Asn | Cys | Arg | Leu | Thr | Tyr | |
| | | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |

| | | |
|----|---|-----|
| | aag cgg gga aat gaa gtt cca tcg gac ggt aaa tat ggt tta agt aaa | 432 |
| | Lys Arg Gly Asn Glu Val Pro Ser Asp Gly Lys Tyr Gly Leu Ser Lys | |
| | 130 135 140 | |
| 5 | aag gca atc aaa gag ctg act aag cta att atg acc cct gaa gaa aaa | 480 |
| | Lys Ala Ile Lys Glu Leu Thr Lys Leu Ile Met Thr Pro Glu Glu Lys | |
| | 145 150 155 160 | |
| 10 | ttg gga agg gag act att ggt gaa tac ttc tct gat gat ttc ttt gaa | 528 |
| | Leu Gly Arg Glu Thr Ile Gly Glu Tyr Phe Ser Asp Asp Phe Phe Glu | |
| | 165 170 175 | |
| | agc aat ttc tgg att tat tgg tca aca atg ttt gcg ttt gaa cgg tgg | 576 |
| 15 | Ser Asn Phe Trp Ile Tyr Trp Ser Thr Met Phe Ala Phe Glu Arg Trp | |
| | 180 185 190 | |
| | cac tct cta gct gaa atg cgt cgt tat atg atg cgg ttt att cac cat | 624 |
| 20 | His Ser Leu Ala Glu Met Arg Arg Tyr Met Met Arg Phe Ile His His | |
| | 195 200 205 | |
| | att gat ggt tta ccg gat ttc act gca ctg aag ttt aat aag tat aac | 672 |
| | Ile Asp Gly Leu Pro Asp Phe Thr Ala Leu Lys Phe Asn Lys Tyr Asn | |
| | 210 215 220 | |
| 25 | caa tat gaa tca atg acc aag ccg cta ttg gcc tac ctg aaa gat cat | 720 |
| | Gln Tyr Glu Ser Met Thr Lys Pro Leu Leu Ala Tyr Leu Lys Asp His | |
| | 225 230 235 240 | |
| 30 | cat gtc aag att gag tac gat acc cag gta aag aat gtt att gtt gat | 768 |
| | His Val Lys Ile Glu Tyr Asp Thr Gln Val Lys Asn Val Ile Val Asp | |
| | 245 250 255 | |
| | act cat ggg cgg caa aag cac gct aag cga atc tta tta act caa gcc | 816 |
| 35 | Thr His Gly Arg Gln Lys His Ala Lys Arg Ile Leu Leu Thr Gln Ala | |
| | 260 265 270 | |
| | ggt aaa gat aaa gtt gtt gag tta acg gac aat gac ctt gtc ttt gtc | 864 |
| 40 | Gly Lys Asp Lys Val Val Glu Leu Thr Asp Asn Asp Leu Val Phe Val | |
| | 275 280 285 | |
| | aca aac ggt tca att aca gaa agt tct act tac ggc agt cac cat caa | 912 |
| | Thr Asn Gly Ser Ile Thr Glu Ser Ser Thr Tyr Gly Ser His His Gln | |
| | 290 295 300 | |
| 45 | gca gct cga cca acg caa gca ctt ggt ggt agt tgg aaa ctg tgg gaa | 960 |
| | Ala Ala Arg Pro Thr Gln Ala Leu Gly Gly Ser Trp Lys Leu Trp Glu | |
| | 305 310 315 320 | |

| | | |
|----|---|------|
| | aac ctt gct cgg cag tca gct gat ttt ggt cat cct gat gtc ttt tgc | 1008 |
| | Asn Leu Ala Arg Gln Ser Ala Asp Phe Gly His Pro Asp Val Phe Cys | |
| | 325 330 335 | |
| 5 | aag aat ctt cca ggg aga agc tgg ttc att tcc gct act gca acc gtt | 1056 |
| | Lys Asn Leu Pro Gly Arg Ser Trp Phe Ile Ser Ala Thr Ala Thr Val | |
| | 340 345 350 | |
| 10 | aag aac ccg caa gtt gaa cca tac att gaa cgc tta acc aag cga gat | 1104 |
| | Lys Asn Pro Gln Val Glu Pro Tyr Ile Glu Arg Leu Thr Lys Arg Asp | |
| | 355 360 365 | |
| 15 | ctc cat gat ggc aaa gtt aat act ggt gga atc att acg gtc act gac | 1152 |
| | Leu His Asp Gly Lys Val Asn Thr Gly Gly Ile Ile Thr Val Thr Asp | |
| | 370 375 380 | |
| 20 | tct aat tgg atg ctt tcc tgg aca att cac cgt caa ccg cac ttc aag | 1200 |
| | Ser Asn Trp Met Leu Ser Trp Thr Ile His Arg Gln Pro His Phe Lys | |
| | 385 390 395 400 | |
| 25 | aaa caa aag aaa aat gaa acc att gtt tgg att tac ggt ctg tac tct | 1248 |
| | Lys Gln Lys Lys Asn Glu Thr Ile Val Trp Ile Tyr Gly Leu Tyr Ser | |
| | 405 410 415 | |
| 30 | aat aca aag gga aac tat att aag aaa cgg atc gtt gat tgt act ggt | 1296 |
| | Asn Thr Lys Gly Asn Tyr Ile Lys Lys Arg Ile Val Asp Cys Thr Gly | |
| | 420 425 430 | |
| 35 | gaa gag att act aaa gaa tgg cta tcc atc tgg ggg ttc cag aag ccg | 1344 |
| | Glu Glu Ile Thr Lys Glu Trp Leu Ser Ile Trp Gly Phe Gln Lys Pro | |
| | 435 440 445 | |
| 40 | tta att gac gat ttg gct aag gag agt tca att aat act gtt cca gta | 1392 |
| | Leu Ile Asp Asp Leu Ala Lys Glu Ser Ser Ile Asn Thr Val Pro Val | |
| | 450 455 460 | |
| 45 | tat atg cca ttt atc act agc tac ttt atg cca cga gtt aag ggc gac | 1440 |
| | Tyr Met Pro Phe Ile Thr Ser Tyr Phe Met Pro Arg Val Lys Gly Asp | |
| | 465 470 475 480 | |
| 50 | cgt cca gac gtt gtt cca gaa gga tcc gct aac ttg gca ttt att ggt | 1488 |
| | Arg Pro Asp Val Val Pro Glu Gly Ser Ala Asn Leu Ala Phe Ile Gly | |
| | 485 490 495 | |
| 55 | aac ttt gct gaa tct cca agt cga gat acc gta ttt acc acg gaa tat | 1536 |
| | Asn Phe Ala Glu Ser Pro Ser Arg Asp Thr Val Phe Thr Thr Glu Tyr | |
| | 500 505 510 | |

tca gta cgg acc gca atg gaa gcc gtc tac act cta tta gat gtt gat 1584
 Ser Val Arg Thr Ala Met Glu Ala Val Tyr Thr Leu Leu Asp Val Asp
 515 520 525
 5
 cgg gga gtt cca gaa gtc ttt aac tct att tat gat ctt cga gag tta 1632
 Arg Gly Val Pro Glu Val Phe Asn Ser Ile Tyr Asp Leu Arg Glu Leu
 530 535 540
 10 atg cgg gca atg tat tac atg aat gat aag aag ccg tta aaa gac atg 1680
 Met Arg Ala Met Tyr Tyr Met Asn Asp Lys Lys Pro Leu Lys Asp Met
 545 550 555 560
 gac ttg cca att cca aag att gtt gaa aag cca tta tta aag aaa ctc 1728
 15 Asp Leu Pro Ile Pro Lys Ile Val Glu Lys Pro Leu Leu Lys Lys Leu
 565 570 575
 caa gga acg tgg att ggt gaa tta atg gag caa cag cac tta cta taa 1776
 20 Gln Gly Thr Trp Ile Gly Glu Leu Met Glu Gln Gln His Leu Leu
 580 585 590
 <210> 12
 25 <211> 591
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus reuteri
 30
 <400> 12
 35 Met Tyr Tyr Ser Asn Gly Asn Tyr Glu Ala Phe Ala Arg Pro Lys Lys
 1 5 10 15
 Pro Ala Gly Val Asp Lys Lys His Ala Tyr Ile Val Gly Gly Gly Leu
 40 20 25 30
 Ala Gly Leu Ser Ala Ala Val Phe Leu Ile Arg Asp Ala Gln Met Pro
 35 40 45
 45
 Gly Glu Asn Ile His Ile Leu Glu Glu Leu Pro Val Ala Gly Gly Ser
 50 55 60

Leu Asp Gly Glu Asp Arg Pro Gly Ile Gly Phe Val Thr Arg Gly Gly
 65 70 75 80
 5

Arg Glu Met Glu Asn His Phe Glu Cys Met Trp Asp Met Tyr Arg Ser
 85 90 95

10

Ile Pro Ser Leu Glu Ile Pro Gly Ala Ser Tyr Leu Asp Glu Tyr Tyr
 100 105 110

15

Trp Leu Asp Lys Glu Asp Pro Asn Ser Ser Asn Cys Arg Leu Thr Tyr
 115 120 125

20

Lys Arg Gly Asn Glu Val Pro Ser Asp Gly Lys Tyr Gly Leu Ser Lys
 130 135 140

25

Lys Ala Ile Lys Glu Leu Thr Lys Leu Ile Met Thr Pro Glu Glu Lys
 145 150 155 160

Leu Gly Arg Glu Thr Ile Gly Glu Tyr Phe Ser Asp Asp Phe Phe Glu
 165 170 175

30

Ser Asn Phe Trp Ile Tyr Trp Ser Thr Met Phe Ala Phe Glu Arg Trp
 180 185 190

35

His Ser Leu Ala Glu Met Arg Arg Tyr Met Met Arg Phe Ile His His
 195 200 205

40

Ile Asp Gly Leu Pro Asp Phe Thr Ala Leu Lys Phe Asn Lys Tyr Asn
 210 215 220

45

Gln Tyr Glu Ser Met Thr Lys Pro Leu Leu Ala Tyr Leu Lys Asp His
 225 230 235 240

His Val Lys Ile Glu Tyr Asp Thr Gln Val Lys Asn Val Ile Val Asp
 245 250 255

Thr His Gly Arg Gln Lys His Ala Lys Arg Ile Leu Leu Thr Gln Ala
 260 265 270
 5

Gly Lys Asp Lys Val Val Glu Leu Thr Asp Asn Asp Leu Val Phe Val
 275 280 285
 10

Thr Asn Gly Ser Ile Thr Glu Ser Ser Thr Tyr Gly Ser His His Gln
 290 295 300
 15

Ala Ala Arg Pro Thr Gln Ala Leu Gly Gly Ser Trp Lys Leu Trp Glu
 305 310 315 320
 20

Asn Leu Ala Arg Gln Ser Ala Asp Phe Gly His Pro Asp Val Phe Cys
 325 330 335
 25

Lys Asn Leu Pro Gly Arg Ser Trp Phe Ile Ser Ala Thr Ala Thr Val
 340 345 350
 30

Lys Asn Pro Gln Val Glu Pro Tyr Ile Glu Arg Leu Thr Lys Arg Asp
 355 360 365
 35

Leu His Asp Gly Lys Val Asn Thr Gly Gly Ile Ile Thr Val Thr Asp
 370 375 380
 40

Lys Gln Lys Lys Asn Glu Thr Ile Val Trp Ile Tyr Gly Leu Tyr Ser
 405 410 415
 45

Asn Thr Lys Gly Asn Tyr Ile Lys Lys Arg Ile Val Asp Cys Thr Gly
 420 425 430
 50

Glu Glu Ile Thr Lys Glu Trp Leu Ser Ile Trp Gly Phe Gln Lys Pro
 435 440 445
 55

Leu Ile Asp Asp Leu Ala Lys Glu Ser Ser Ile Asn Thr Val Pro Val
 450 455 460
 5

Tyr Met Pro Phe Ile Thr Ser Tyr Phe Met Pro Arg Val Lys Gly Asp
 465 470 475 480
 10

Arg Pro Asp Val Val Pro Glu Gly Ser Ala Asn Leu Ala Phe Ile Gly
 485 490 495
 15

Asn Phe Ala Glu Ser Pro Ser Arg Asp Thr Val Phe Thr Thr Glu Tyr
 500 505 510
 20

Ser Val Arg Thr Ala Met Glu Ala Val Tyr Thr Leu Leu Asp Val Asp
 515 520 525
 25

Arg Gly Val Pro Glu Val Phe Asn Ser Ile Tyr Asp Leu Arg Glu Leu
 530 535 540
 30

Met Arg Ala Met Tyr Tyr Met Asn Asp Lys Lys Pro Leu Lys Asp Met
 545 550 555 560
 35

Asp Leu Pro Ile Pro Lys Ile Val Glu Lys Pro Leu Leu Lys Lys Leu
 565 570 575
 40

Gln Gly Thr Trp Ile Gly Glu Leu Met Glu Gln Gln His Leu Leu
 580 585 590
 45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/06833

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C11C3/14 C12N9/90 C12N15/61 C12N15/82 C12P7/64
A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | WO 01 00846 A (DCV INC D B A BIO TECHNICAL RE) 4 January 2001 (2001-01-04) cited in the application SEQ ID NO 18 & 61 the whole document | 1-25 |
| X | WO 99 32604 A (DCV INC) 1 July 1999 (1999-07-01) cited in the application the whole document | 15-20,22 |
| | -/-- | |

Further documents are listed in the continuation of box C:

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 October 2003

Date of mailing of the international search report

03/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/06833

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | <p>AOTA S ET AL: "CODON USAGE TABULATED FROM THE GENBANK GENETIC SEQUENCE DATA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 16, no. SUPPL, 1988, pages R315-R402, XP001155211 ISSN: 0305-1048 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> | |
| A | <p>KORESAWA Y ET AL: "A new Cre recombinase gene based on optimal codon usage in mammals: a powerful material for organ-specific gene targeting" TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, ORLANDO, FL, US, vol. 32, no. 7, November 2000 (2000-11), pages 2516-2517, XP002246030 ISSN: 0041-1345 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> | |
| A | <p>NARUM D L ET AL: "Codon optimization of gene fragments encoding Plasmodium falciparum merozoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 69, no. 12, December 2001 (2001-12), pages 7250-7253, XP002241020 ISSN: 0019-9567 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> | |
| A | <p>KIM C H ET AL: "Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 199, no. 1-2, 15 October 1997 (1997-10-15), pages 293-301, XP004126394 ISSN: 0378-1119 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> | |
| A | <p>FLINTA C ET AL: "Sequence determinants of cytosolic N-terminal protein processing." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY / FEBS. GERMANY, WEST 2 JAN 1986, vol. 154, no. 1, 2 January 1986 (1986-01-02), pages 193-196, XP009020015 ISSN: 0014-2956 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> | |
| | -/-- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 03/06833

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| P,X | WO 02 101056 A (ZELDER OSKAR ;STANTON CATHERINE (IE); TEAGASC DAIRY PRODUCTS RES C) 19 December 2002 (2002-12-19) the whole document ----- | 1-25 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP03/06833

| Patent document cited in search report | A | Publication date | | Patent family member(s) | Publication date |
|--|---|------------------|----|-------------------------|------------------|
| WO 0100846 | A | 04-01-2001 | CA | 2377473 A1 | 04-01-2001 |
| | | | EP | 1196597 A2 | 17-04-2002 |
| | | | JP | 2003503061 T | 28-01-2003 |
| | | | WO | 0100846 A2 | 04-01-2001 |
| | | | | | |
| WO 9932604 | A | 01-07-1999 | AU | 2015099 A | 12-07-1999 |
| | | | EP | 1042451 A1 | 11-10-2000 |
| | | | JP | 2002508929 T | 26-03-2002 |
| | | | WO | 9932604 A1 | 01-07-1999 |
| | | | | | |
| WO 02101056 | A | 19-12-2002 | EP | 1264893 A1 | 11-12-2002 |
| | | | WO | 02101056 A2 | 19-12-2002 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/06833

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C11C3/14 C12N9/90 C12N15/61 C12N15/82 C12P7/64
A01H5/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie ^o | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------------------|--|--------------------|
| X | WO 01 00846 A (DCV INC D B A BIO TECHNICAL RE) 4. Januar 2001 (2001-01-04) in der Anmeldung erwähnt SEQ ID NO 18 & 61 das ganze Dokument --- | 1-25 |
| X | WO 99 32604 A (DCV INC) 1. Juli 1999 (1999-07-01) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument --- | 15-20, 22 |
| | -/-- | |

* Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C' zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Oktober 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/11/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | <p>AOTA S ET AL: "CODON USAGE TABULATED FROM THE GENBANK GENETIC SEQUENCE DATA" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 16, Nr. SUPPL, 1988, Seiten R315-R402, XP001155211 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> | |
| A.. | <p>KORESAWA Y ET AL: "A new Cre recombinase gene based on optimal codon usage in mammals: a powerful material for organ-specific gene targeting" TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, ORLANDO, FL, US, Bd. 32, Nr. 7, November 2000 (2000-11), Seiten 2516-2517, XP002246030 ISSN: 0041-1345 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> | |
| A | <p>NARUM D L ET AL: "Codon optimization of gene fragments encoding Plasmodium falciparum merzoite proteins enhances DNA vaccine protein expression and immunogenicity in mice" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, Bd. 69, Nr. 12, Dezember 2001 (2001-12), Seiten 7250-7253, XP002241020 ISSN: 0019-9567 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> | |
| A | <p>KIM C H ET AL: "Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, Bd. 199, Nr. 1-2, 15. Oktober 1997 (1997-10-15), Seiten 293-301, XP004126394 ISSN: 0378-1119 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> | |
| A | <p>FLINTA C ET AL: "Sequence determinants of cytosolic N-terminal protein processing." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY / FEBS. GERMANY, WEST 2 JAN 1986, Bd. 154, Nr. 1, 2. Januar 1986 (1986-01-02), Seiten 193-196, XP009020015 ISSN: 0014-2956 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p> | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen ..

PCT/EP 03/06833

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| P, X | WO 02 101056 A (ZELDER OSKAR ; STANTON CATHERINE (IE); TEAGASC DAIRY PRODUCTS RES C) 19. Dezember 2002 (2002-12-19) das ganze Dokument ----- | 1-25 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/06833

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 0100846 A | 04-01-2001 | CA 2377473 A1 | 04-01-2001 |
| | | EP 1196597 A2 | 17-04-2002 |
| | | JP 2003503061 T | 28-01-2003 |
| | | WO 0100846 A2 | 04-01-2001 |
| WO 9932604 A | 01-07-1999 | AU 2015099 A | 12-07-1999 |
| | | EP 1042451 A1 | 11-10-2000 |
| | | JP 2002508929 T | 26-03-2002 |
| | | WO 9932604 A1 | 01-07-1999 |
| WO 02101056 A | 19-12-2002 | EP 1264893 A1 | 11-12-2002 |
| | | WO 02101056 A2 | 19-12-2002 |