

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

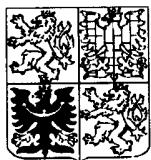
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3135-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14. 02. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.03.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/9601236**

(33) Země priority: **SE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12. 05. 99**
(Věstník č. 5/99)

(86) PCT číslo: **PCT/SE97/00247**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/37033**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 P 7/64
C 12 N 9/02
A 01 H 5/10

(71) Přihlášovatel:

BAFOR Maureen, Benin City, NG;
BANAS Antoni, Siedlce, PL;
DAHLQVIST Anders, Furulund, SE;
GUMMESON Per-Olov, Lund, SE;
LEE Michael, Klagstorp, SE;
LENMAN Marit, Lund, SE;
SJÖDAHL Staffan, Uppsala, SE;
STYMNE Sten, Svalöv, SE;

(72) Původce:

Bafor Maureen, Benin City, NG;
Banas Antoni, Siedlce, PL;
Dahlqvist Anders, Furulund, SE;
Gummeson Per-Olov, Lund, SE;
Lee Michael, Klagstorp, SE;
Lenman Marit, Lund, SE;
Sjödahl Staffan, Uppsala, SE;
Stymne Sten, Svalöv, SE;

(74) Zástupce:

Zelený Pavel JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Nový rostlinný enzym a jeho použití

(57) Anotace:

Způsob produkce acetylenových sloučenin spočívá v tom, že dvojná vazba je přeměněna na acetylenovou vazbu působením acetylenasy. Nový rostlinný enzym delta /12/ acetylenasa mastných kyselin je odpovědný za konversi mastných kyselin na acetylenové kyseliny a vynález se týká produkce takových kyselin. Vynález se také týká použití cDNA kódující acetylenasu, výhodné Crepis alpina delta /12/ acetylenasu, pro transformaci organismů jako jsou organismy akumulující oleje vybrané ze skupiny skládající se z olejnatých plodin, oleogenních kvasinek a

plísní. Kromě toho se vynález týká organismů, jako jsou organismy akumulující oleje, transformovaných acetylenasovou cDNA a olejů a jiných acetylenových sloučenin z uvedených organismů.

CZ 3135-98 A3

Nový rostlinný enzym a jeho použití

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nového rostlinného enzymu. Přesněji, předkládaný vynález se týká způsobu pro produkci acetylenových sloučenin v určitých acetylenových mastných kyselinách, cDNA kodující rostlinnou acetylenasu mastných kyselin, použití uvedené cDNA pro transformaci organismů akumulujících oleje za účelem produkce acetylenových mastných kyselin jako takových, organismů produkujících olej, stejně jako olejů z nich vyrobených.

Dosavadní stav techniky

Ve světě je značný zájem o produkci chemických surovin jako jsou mastné kyseliny pro průmyslové použití z obnovitelných rostlinných zdrojů, spíše než z neobnovitelných petrochemikálií. Toto pojetí má značný význam jak pro výrobce, tak pro spotřebitele, vzhledem k zachování zdroje a kromě toho poskytuje významné možnosti pro vývoj nových industriálních plodin pro zemědělství.

Existuje značná rozmanitost neobvyklých mastných kyselin v olejích z přirozených druhů rostlin, které byly dobře charakterizovány (viz například Badami a Patil, 1981). Mnoho z těchto kyselin je potenciálně možno použít v průmyslu. Toto vedlo k zájmu o umožnění zemědělské produkce určitých mastných kyselin v domestikovaných odpovídajících druzích rostlin. Nicméně, rozvoj genového inženýrství v kombinaci s důkladnějším pochopením biosyntesy neobvyklých mastných kyselin nyní umožňuje

provést genový přenos genů kodujících klíčové enzymy, které se účastní syntesy určité aminokyseliny z přirozených druhů, do vybrané domestikované plodiny s olejnatými semeny. Tímto způsobem mohou být produkovány specifické mastné kyseliny vysoké čistoty a množství za přijatelných nákladů.

Jednou třídou mastných kyselin, která je zejména zajímavá, jsou acetylenové mastné kyseliny, skládající se z acylového řetězce majícího dva sousední uhlíkové atomy navázané acetylenovou neboli trojnou vazbou. Vzhledem ke své vysoké reaktivitě mohou být ideálně vhodné pro produkci potahů, plastů a mazacích činidel. Přenosem genů odpovědných za produkci specifických acetylenových kyselin z přirozených druhů do komerčních druhů s olejnatými semeny, nebo do jakéhokoli jiného organismu, který akumuluje oleje, který může být snadno množen, by mělo být možné vyvinout obnovitelný primární zdroj tohoto oleje obsahujícího acetylenové mastné kyseliny pro průmyslové použití.

Tvorba acetylenových vazeb v mastných kyselinách v různých druzích mechu probíhá pomocí odstranění vodíků z dvojné vazby (Kohn a kol., 1994).

Druhy *Crepis* mají olejnatá semena s vysokým obsahem acetylenových kyselin (Badami a Patil, 1981; Hirsinger, 1991).

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje nový způsob pro produkci acetylenových mastných kyselin z transgenních organismů akumulujících oleje.

Původci charakterizovali enzym (acetylenasu), který je odpovědný za produkci 9-oktadecen-12-inové kyseliny (dále též "krepeninová kyselina") z 9,12-oktadekadienové kyseliny (kyselina linolová) v membránových frakcích z vyvíjejících se semen *Crepis alpina*. Charakterizace acetylenasy z *Crepis alpina* ukázala, že acetylenasa má velmi podobné biochemické vlastnosti jako non-hem obsahující monooxygenasy oleat delta 12 a linoleát delta 15 (omega 3) desaturasy. Na základě předpokladu, že biochemická podobnost pozorovaná mezi acetylenasou a enzymy produkujícími kyselinu linolovou a kyselinu linolenovou (delta 12 a delta 15 desaturasy) by mohla být také spojena s podobností v primární sekvenci kompletní cDNA těchto proteinů (pCrepl), kodující domnělou acetylenasu, byla izolována z *Crepis alpina*.

Nejprve byly z *Crepis alpina* charakterizovány dva typy cDNA fragmentů, získaných za použití PCR a primerů navržených za pomoci seřazení proteinových sekvencí delta 12 desaturas. Analýza DNA sekvence ukázala, že je vysoce homologní ke všem jiným rostlinným endoplasmatickým retikulárním (ER) delta 12 desaturasám a hydroxylase z ricinových bobů. Další charakterizovaný cDNA fragment měl sekvenci, která byla homologní k sekvenci rostlinné ER delta 12 desaturasy, ale byl odlišný nejen v počtu nekonzervovaných aminových zbytků, ale také v počtu aminokyselinových zbytků, které byly vysoce konzervované ve všech delta 12 ER desaturasách. Za použití Northern blot analýz genu kodujícího tuto cDNA (pCrepl) bylo zjištěno, že vysoce exprimována specificky pouze v semenech, ve srovnání s expresí v tkáni listu. Tato zjištění dohromady a uvážení jedinečného biochemického charakteru buněk v semenech poskytují silný důkaz toho, že izolovaná cDNA (pCrepl) z *C. alpina* koduje enzym

odpovědný za konversi kyseliny linolové na 9-oktadecen-12-inovou kyselinu, tedy "krepeninovou kyselinu".

Nakonec, konečný důkaz, že cDNA, pCrep1, z *C. alpina* koduje rostlinný enzym acetylenasa, byl získán expresí tohoto genu ve kvasinkách. Exprese tohoto genu spolu s přidáním kyseliny linolové do kultury těchto kvasinek vedla k produkci delta 12 acetylenové kyseliny, 9-oktadecen-12-inové kyseliny ("krepeninové kyseliny"), jak bylo potvrzeno analýzou extrahovaných kvasinkových mastných kyselin za použití analýzy hmotnostní spektrometrií.

Proto, v prvním aspektu, se předkládaný vynález týká způsobů pro produkci acetylenových sloučenin, ve kterých je dvojná vazba konvertována na acetylenovou vazbu acetylenasou.

Ve výhodném provedení způsobu jsou acetylenové mastné kyseliny produkovány konversí nenasycených mastných kyselin na acetylenové mastné kyseliny působením acetylenasy mastných kyselin.

Ve druhém aspektu se vynález týká cDNA kodující acetylenasu monooxygenasového typu se smíšenou funkcí obsahující tři konzervované histidinové motivy ($HX_{(3 \text{ nebo } 4)}^H$, $HX_{(2 \text{ nebo } 3)}^{HH}$ a $HX_{(2 \text{ nebo } 3)}^{HH}$) podle obrázku 1 na připojených výkresech.

V dalším provedení se vynález týká cDNA kodující acetylenasu mastných kyselin, jako je *Crepis alpina* delta 12 acetylenasa obsahující sekvenci podle obrázku 3 na připojených výkresech nebo jakoukoliv nukleotidovou sekvenci, která je k ní významně homologní.

Ve třetím aspektu se vynález týká použití výše popsané cDNA pro transformaci organismů. Organismem může být organismus akumulující acetylenové sloučeniny nebo organismus akumulující oleje, v příslušném pořadí.

Ve čtvrtém aspektu se vynález týká organismů transformovaných cDNA pro acetylenasu jak byla popsána výše. Organismy akumulují acetylenové sloučeniny nebo oleje, jejich příklady jsou olejnaté plodiny, oleogenní kvasinky a plísně.

V pátém aspektu se vynález týká acetylenových sloučenin akumulovaných v organismech popsaných výše.

V šestém aspektu se vynález týká olejů z organismů akumulujících oleje popsaných výše.

Ve výhodném provedení se předkládaný vynález týká transformace organismů akumulujících oleje uvedenou izolovanou cDNA z cDNA knihovny semen *Crepis alpina* za účelem produkce acetylenových mastných kyselin a konkrétně 9-oktadecen-12-inové kyseliny ("krepeninové kyseliny").

Olej semen *C. alpina* je bohatý na 9-oktadecen-12-inovou kyselinu ("krepeninovou kyselinu") (Hirsinger, 1989)). Původci studovali syntézu kyseliny 9-oktadecen-12-inové ("krepeninové kyseliny") v semenech *C. alpina*. Přívod exogenních $1-^{14}\text{C}$ -značených volných mastných kyselin do intaktních vyvíjejících se kotyledonů semen *C. alpina* prokázalo, že linoleat je prekursor kyseliny 9-oktadecen-12-inové ("krepeninová kyselina"). Toto je v protikladu k dříve publikovaným výsledkům pro biosyntesu kyseliny 9-oktadecen-12-inové ("krepeninové kyseliny") v *Crepis rubra* (Haigh a James, 1967). Ačkoliv bylo prokázáno, že reakce

tvorby acetylenových kyselin v mechách je desaturační proces (Kohn a kol., 1994), může být takový desaturační proces proveden mnoha různými typy nepříbuzných rostinných enzymů, jako jsou fytoen desaturasy (Wieland a kol., 1994) nebo non-hem obsahující proteiny, kde z druhé uvedené třídy enzymů některé vykazují velmi malé homologie aminokyselinové sekvence, kromě tří konzervovaných histidinových motivů (Shanklin a kol., 1994). Bylo naznačeno, že biosyntesa acetylenových mastných kyselin probíhá přes sekvenci meziproduktů katalyzovaných různými enzymatickými reakcemi. Například, soudilo se, že acetylenové vazby jsou tvořeny jako vedlejší metabolická dráha syntesy nasycených mastných kyselin (Diedrich a Henschel, 1991); nebo přes epoxigenaci dvojné vazby s následnou konversí na diol, který je potom dehydratován ve dvou krocích za tvorby acetylenové vazby (Van de Loo a kol., 1993). Vzhledem k těmto protikladným alternativám nebyl v době podání předkládané patentové přihlášky SE 9601236-4 znám vůbec nebo nebyl zřejmý charakter enzymu acetylenasa ani mechanismus jeho účinku.

Enzym podle předkládaného vynálezu, který je odpovědný za syntesu kyseliny 9-oktadecen-12-inové ("krepeninové kyseliny") (nazvaný delta 12 acetylenasa), byl podle vynálezců prokázán aktivní pouze v membránových (mikrosomálních) frakcích připravených z vyvíjejících se semen *Crepis alpina*, za podmínek, že homogenizační pufr obsahoval NADH nebo NADPH, katalasu a volný koenzym A. Charakterizace mikrosomální acetylenasy a její srovnání s delta 12 desaturasou (odpovědnou za desaturaci oleatu na linoleat) ukázala, že tyto enzymy mají velmi podobné vlastnosti. Oba enzymy vyžadují O_2 a NADH nebo NADPH; kde obě koredukční činidla působí stejně s oběma enzymy. Kyanid (CN^-) a protilátky proti květákovému cytochromu b_5 inhibovaly oba tyto

enzymy, zatímco oxid uhelnatý neměl signifikantní účinek na aktivitu ani jednoho enzymu. Tato data naznačují, že oba enzymy jsou biochemicky podobné. Oleat delta 12 hydroxylasa z ricinových bobů má také podobné biochemické vlastnosti jako delta 12 desaturasa i přesto, že katalyzuje různé reakce (Bafor a kol., 1991; Smith a kol., 1992). Později bylo prokázáno, že gen pro delta 12 hydroxylasu z ricinových bobů má signifikantní homologii sekvence s geny pro ER delta 12 desaturasu (FAD 2 geny) (Van de Loo a kol., 1995). Protože delta 12 acetylenasa, stejně jako delta 12 desaturasy (FAD2), katalyzuje dehydrogenaci mezi uhlíky 12 a 13 acylového řetězce a podobně jako delta 15 desaturasa (FAD3) využívá kyselinu linolovou jako substrát, vynálezci usoudili, že gen pro acetylenasu by mohl mít určitou homologii sekvence s geny pro FAD2 a/nebo FAD3.

Vynález bude nyní podrobněji popsán v následujících příkladech a připojených výkresech.

Popis obrázků na výkresech

Obrázek 1: Restrikční mapa pCrep1.

Obrázek 2: Restrikční mapa pVT-Crep1.

Obrázek 3: Superponované chromatogramy jednotlivých iontů 333, 365, 367 z FADEA připravených z celkových mastných kyselin extrahovaných z kvasinek kmene YN94-1 transformovaných pVT-Crep1. Písmena označují píky představující následující diethylamidové deriváty mastných kyselin: A, kyselina eikosanová; B, kyselina eikosaenová; C, 9-oktadecen-12-inová kyselina.

Obrázek 4: Superponované chromatogramy jednotlivých iontů 333, 365, 367 z FADEA připravených z celkových mastných kyselin extrahovaných z kvasinek kmene YN94-1 transformovaných prázdným vektorem (pVT100U; kontrola). Písmena označují píky představující následující diethylamidové deriváty mastných kyselin: A, kyselina eikosanová; B, kyselina eikosaenová.

Obrázek 5: Celkový iontový chromatogram FADEA připravených z mastných kyselin obohacených v domnělé 9-oktadecen-12-inové kyselině z lipidových extraktů z YN94-1 transformovaných pVT-Crep1. Písmena označují píky představující následující diethylamidové deriváty mastných kyselin: A, kyselina hexadekanová; B, kyselina oktadekanová; C, oktadeka-9, 12-dienoová kyselina; D, 9-oktadecen-12-inová kyselina.

Obrázek 6: Hmotnostní spektrum sloučenin odpovídajícím píku D na obrázku 5.

Příklady provedení vynálezu

Klonování předpokládaného genu pro acetylenasu

Srovnání aminokyselinových sekvencí z různých druhů ukázalo, že desaturasy mastných kyselin vázané na membrány mohou být přiřazeny do tří různých skupin podle homologie jejich předpokládaného zralého proteinu (plastid delta 12 desaturasy, ER delta 12 desaturasy a delta 15 desaturasy; viz seznam sekvencí 1). Hydroxylasa z ricinových bobů (Van de Loo a kol., 1995) má vysokou homologii s ER delta 12 desaturasami, která je takového stupně, že tyto sekvence nejsou snadno rozlišitelné. Kromě toho, sekvence ze všech tří tříd enzymů vykazují mezi sebou určitý

stupeň homologie sekvence.

Na základě tohoto srovnání byly navrženy oligonukleotidové primery a byly syntetizovány pro tyto tři skupiny sekvencí a pro konsensus všech těchto sekvencí. Sekvence těchto primerů jsou uvedeny dále.

(i) konsensuální primery (primery navržené pro konsensus všech tří skupin desaturas vázaných na membrány a hydroxylasu mastných kyselin z ricinových bobů):

sense primer: GSN CAY GAN TGY GSN CAY

antisense primer: RAN ADR TGR TGN RBN AYR TG.

(ii) primery pro plastid delta 12 desaturasy:

sense primer: TGG MGN TTY AAR CAY GAY MG

antisense primer: GTN SWC ATC CAR AAR TGR TA.

(iii) primery pro ER delta 12 desaturasy včetně hydroxylasy mastných kyselin z ricinových bobů:

sense primer: CAY GAR TGY GGN CAY CAY GC

antisense primer: CCN CKN ARC CAR TCC CAY TC.

(iv) primery pro delta 15 desaturasy:

sense primer: ACN CAY CAY CARAAY CAY GG

antisense primer: CAY TGY TTN CCN CKR TAC CA.

Poly A+ RNA byla izolována z vyvíjejících se semen (100 mg)

C. alpina za použití QuickPrep Micro mRNA přečišťovacího kitu od Pharmacia Biotech. Všechna poly A+ RNA z tohoto přečištění byla vysrážena a použita k syntese prvního řetězce cDNA, který byl započat jak oligo dT, tak náhodnými hexamery a který byl syntetizován za použití Superscript II reversní transkriptasy od Gibco BRL. Potom byla použita polymerasová řetězová reakce (PCR), s uvedenými primery a touto cDNA, pro amplifikaci produktů s následujícími podmínkami pro cykly: 1 cyklus při 94 °C po dobu 2 minut, 30 cyklů (94 °C, 30 sekund; 50 °C, 30 sekund; 72 °C, 30 sekund) a nakonec jeden cyklus 72 °C po dobu 5 minut.

Produkty byly získány pro všechny použité primery; zajímavé je, že primery proti ER delta 12 desaturasám dávaly výrazně více produktu, než ostatní použité primery. Velikost PCR produktů z delta 12 a delta 15 primerů odpovídala předpokládané velikosti.

PCR produkty získané amplifikací s ER delta 12 primery a delta 15 primery byly tupě zakončeny T4 a klenow polymerasami a byly klonovány do EcoRV místa plasmidového vektoru Bluescript. DNA sekvencování mnoha klonů ukázalo, že za použití těchto dvou sad primerů byly amplifikovány alespoň tři různé sekvence: (i) vysoce konzervovaná sekvence delta 15 desaturasy, (ii) vysoce konzervovaná sekvence ER delta 12 a (iii) sekvence (D12V) mající homologii k ER delta 12 sekvencím, ale vykazující různé odlišnosti i v některých aminokyselinových zbytcích, které byly vysoce konzervovány ve všech jiných sekvencích pro desaturasy.

Analýza mastných kyselin z *C. alpina* ukázala, že kyselina 9-oktadecen-12-inová ("krepeninová kyselina") je pravděpodobně přítomna pouze v semenech. Northern blot analýza při vysoké přísnosti ukázala, že mRNA z D12V sekvence popsané výše byla

exprivována ve vysokém množství v semenech, ale nikoliv v listech, což je v souladu s pozorováním, že kyselina 9-oktadecen-12-inová ("krepeninová kyselina") byla pozorována pouze v semenech.

cDNA knihovna byla připravena z vyvíjejících se semen z *C. alpina* za použití Uni-ZAP XR klonovacího kitu pro cDNA od Stratagene a byla vyšetřována náhodně značenou D12V sekvencí. Z tohoto vyšetřování bylo hodnoceno, že cDNA kodující D12V sekvence byla přítomna ve značném množství; což předpokládá vysoký stupeň exprese tohoto genu. Po izolaci jednotlivě hybridizujících lambda plaků byl pBluescript fagemid excidován za použití ExAssist/SOLR systému od Stratagene. Takto získané fagemidy byly potom použity pro produkci dvojřetězcového DNA plasmidu. Z těchto kolonií byl izolován kompletní klon (pCrep1, viz obrázek 1) za použití DNA sekvencování a restričního mapování izolovaného plasmidu. Insert z pCrep1, 1,5 kb insert obsažený ve vektoru pBluescript SK, byl sekvencován a z tohoto insertu byl odvozen otevřený čtecí rámeček kodující 375 aminokyselinový protein (seznam sekvencí 2). Analýza sekvence tohoto proteinu ukázala přibližně 60% identitu a 80% podobnost s jinými rostlinnými delta 12 desaturasovými proteiny a přítomnost zaznamenání hodných rozdílů v homologii, kdy určité zbytky, které byly konzervovány mezi všemi ostatními desaturasami, nebyly v této sekvenci (viz seznam sekvencí 1). Byly přítomné tři histidinové motivy, které byly prokázány jako konzervované v mnoha non-hem obsahujících monooxygenasách katalyzujících hydroxylaci a desaturační reakce (Shanklin a kol., 1994).

Expresce pCrep cDNA a detekce kyseliny 9-oktadecen-12-inové ("krepeninové kyseliny") v transgenních kvasinkách

pCrep1 otevřený čtecí rámeček byl uvolněn z pCrep1 na SmaI/XhoI restriční fragmentu a 1,5 kb Crep1 otevřeného čtecího rámečku získaného z gelového přečištění (Landridge a kol., 1980). pVT100-U DNA (Vernet a kol., 1987) byla trávena za použití PvuII a XhoI. 50 ng PvuII/XhoI-linearizovaného pVT100 bylo ligováno s 100 ng 1,5 kb SmaI/XhoI fragmentu odpovídajícího Crep1 otevřenému čtecímu rámečku za použití T4 DNA ligasy (NBL Genen Science Ltd., UK). Část ligační směsi byla použita pro transformaci kompetentních *E. coli* DHa buněk. Byl vybrán jeden klon (pVT-Crep1), který obsahoval očekávaný 1,5 kb insert a konstrukt byl ověřen trávením EcoRI nebo HindIII + XbaI. Obě trávení dávala očekávané produkty (přibližně 5,3, 2,3 a 0,8 kb pro EcoRI trávení a 1,5 kb otevřený čtecí rámeček pro HindIII + XbaI trávení). pVT-Crep1 DNA (viz obrázek 2), nebo prázdný vektor pVT100U, byly použity pro transformaci *Saccharomyces cerevisiae* kmenů YN94-1 a C13-ABYS86, za použití PLATE metody podle Elble (1992). Kvasinky transformované přes noc byly kultivovány na SCD minus uracil agaru a jednotlivé kolonie byly přeneseny na čerstvé selektivní (minus uracil) plotny. YN94-1 a C13-ABYS86 kmeny kvasinek transformované pVT-Crep1 DNA a prázdným vektorem (pVT100U; kontrola) byly kultivovány v kulturech s třepáním při 28 °C po dobu pěti hodin v selektivním mediu (bez uracilu; 400 ml) a potom bylo 40 ml kultivačního media obsahujícího kyselinu linolovou rozpuštěnou v Tween 40^R přidáno do kultury v konečné koncentraci 0,03% kyseliny linolové a 1% Tween 40^R (hmotnost/hmotnost). Po kultivaci po dobu dalších 78 hodin při 28 °C byly buňky peletovány centrifugací a byly promyty disperzí ve 20 ml 0,1 M Tris-HCl pufru pH 7,8 obsahujícím 1% Tween 40^R a byly znovu peletovány centrifugací. Buňky byly dále promyty resuspendováním ve 20 ml 0,1 M Tris-HCl pufru pH 7,8 a byly znovu

peletovány. Buňky byly potom extrahovány ve směsi chloroform/methanol/0,15 M kyselina octová (1:2:0,8, uvedeno objemově) v Braun MSK buněčném homogenizátoru se skleněnými korálky (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) při frekvenci otáček 4000 za minutu po dobu 20 sekund. Kvasinkové lipidy byly extrahovány ze směsi do chloroformové fáze přidáním chloroformu a 0,15 M kyseliny octové v konečných poměrech 1:1:0,9 (uvedeno objemu) chloroformu, methanolu a 0,15 M kyseliny octové. Po centrifugaci směsi byla chloroformová fáze obsahující lipidy odstraněna a odpařena do sucha pod proudem dusíku.

Lipofilní zbytek byl methylován methanolicou HCl (4% hmotnost/hmotnost) při 85 °C po dobu 45 minut a potom byly methylestery mastných kyselin extrahovány do n-hexanu. Plynové kapalinové (GC) chromatogramy methylesterů separovaných na skleněných kolonách (2,5 m x 3 mm, vnitřní průměr) obsahujících 3% SP-2300 Supelcoport 100/120 mesh (rozměr částice 0,122 až 0,147 mm) (Supelco, Bellefonte, P. USA) ukázaly pík se stejným retenčním časem jako autentický methylester 9-oktadecen-12-inové kyseliny vytvářející více než 0,3% celkové plochy píků ve vzorkách připravených z kvasinek transformovaných pVT-Crepl, ale nikoliv ve vzorkách připravených z kvasinek obsahujících prázdný vektor (pVT100U; kontrola).

Protože methylestery acetylenových mastných kyselin mohou být částečně separovány od jiných methylesterů mastných kyselin na silikagelové chromatografii na tenké vrstvě, byly methylestery připravené z YN94-1 transformovaných pVT-Crepl separovány na silikagelových 60 plotnách pro chromatografii na tenké vrstvě (Merck, Darmstadt, SRN) vyvíjením ploten v hexan/diethylether/kyselina octová (85:15:1, uvedeno objemově). Oblast

01.03.99

ihned pod hlavní methylesterovou oblastí byla odebrána z plotny a lipidy byly eluovány methanol/chloroform (2:1) a byly analyzovány kapalinovou chromatografií. Frakce se skládaly z methylesterů mastných kyselin, kde pík se stejným retenčním časem jako methylester 9-oktadecen-12-inové kyseliny tvořil více než 12,5% celkové plochy píku.

Methylesterové frakce obohacené o domnělý methylester 9-oktadecen-12-inové kyseliny a celkové methylestery mastných kyselin připravené z YN94-1 transformovaných pVT-Crep1 a YN94-1 transformovaných prázdným vektorem (pVT100U; kontrola) byly hydrolyzovány v 2,5M KOH ve vodném methanolu (15 % objemových methanolu) při 90 °C po dobu 1 hodiny. Volné mastné kyseliny byly extrahovány do hexanu po okyselení HCl a hexanová fáze byla odpařena do sucha pod proudem dusíku.

Diethylamidy mastných kyselin (FADEA) byly připraveny z volných mastných kyselin způsobem podle Nilssona a Liljenberga (1991). FADEA byly buď přímo injikovány do plynové chromatografie s kapalnou stacionární fází spojené s hmotnostním spektrometrem (GS-MS) nebo byly podrobeny dalšímu přečištění silikagelovou chromatografií na tenké vrstvě vyvíjením ploten v heptan/diethylether/kyselina octová (50:50:1, uvedeno objemově).

FADEA byly analyzovány na Hewlett-Packard 5890 II plynovém chromatografu vybaveném DB225 (0,25 mm (vnitřní průměr) x 30 m, J and W, Folsom, USA) v serii s Rtx 2330 (Restek Corp., PA, USA) kapilární kolonou ze slinutého oxidu křemičitého, spojenou s Hewlett-Packard 5989A hmotnostním spektrometrem pracujícím v elektronovém impaktním modu při 70 eV. Injekční technika byla

01.03.99

nepřerušovaná při 100 °C a potom byla teplota co nejrychleji zvýšena na 240 °C. Teplota v pídce byla 100 °C po dobu 7 minut, potom 20 °C za minutu do 190 °C a potom 1 °C za minutu do konečné teploty 225 °C, která je udržována po dobu dalších 20 minut. Pozice dvojně vazby byly určeny podle Nilssona a Liljenberga (1991).

Jednoiontové chromatogramy hmotnostní odpovídajících molekulárnímu iontovému FADEA připravených z celkových mastných kyselin z YN94-1 transformovaných pVT-Crep1 a z YN94-1 transformovaných prázdným vektorem (pVT100U; kontrola) jsou ukázány na obrázku 5 a 6, v příslušném pořadí. Chromatogram FADEA z YN94-1 transformovaných pVT-Crep1 ukázal pík o hmotnosti 333 (odpovídající molekulové hmotnosti diethylamidu kyseliny 9-oktadecen-12-inové), který nebyl přítomen na chromatogramu FADEA z YN94-1 transformovaných prázdným vektorem (pVT100U, kontrola). Pík měl retenční čas 57,3 minuty a byl umístěn mezi píky odpovídající eikosanoidovým a eikosanoidovým FADEA derivátům.

Celkový iontový chromatogram FADEA připravených z mastných kyselin obohacených o domnělou kyselinu 9-oktadecen-12-inovou provedený za použití chromatografie na tenké vrstvě (jak je popsána výše), kde mastné kyseliny pocházejí z lipidových extraktů z YN94-1 transformovaných pVT-Crep1, je ukázán na obrázku 5. Hmotnostní spektrum (obrázek 6) domnělých diethylamidových derivátů kyseliny 9-oktadecen-12-inové (pík D na obrázku 5) ukazuje mezeru v hmotnosti 26 amu místo řádných 28 mezi uhlíkem 7 a 9, což ukazuje na dvojnou vazbu v pozici 9. Kromě toho zde byla mezera 24 amu místo řádných 28 mezi uhlíkem 10 a 12, což ukazuje na přítomnost acetylenové vazby v pozici

01.03.99

12. Pík D produkoval hmotnostní spektrum identické se spektrem autentického diethylamidu kyseliny 9-oktadecen-12-inové připravené z olejů ze semen *Crepis alpina*. Tak pík D v chromatogramu na obrázku 5 byl jednoznačně identifikován jako diethylamidový derivát kyseliny 9-oktadecen-12-inové. Jelikož sloučenina nebyla přítomná v kmenech kvasinek, které nebyly transformovány Crep1 cDNA, je jasné, že Crep1 cDNA koduje delta 12 acetylenasu mastných kyselin.

01.03.99

Odkazy:

- Badami, R.C., and Patil, K.B. (1981). Structure and occurrence of unusual fatty acids in minor seed oils. *Progress in Lipid Research*, 19, 119-53.
- Banas, A., Bafor, M., Wiberg, E., Lenman, M., Ståhl, U. and Stymne, S. (1997) Biosynthesis of an acetylenic fatty acid in microsomal preparations from developing seeds of *Crepis alpina*. In: Williams, J.P., Mobasher, K.U., Lem, N.W. (eds) *Physiology, biochemistry and molecular biology of plant lipids*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. In-press
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523
- Diedrich, M. & Henschel, K.P. (1991) The natural occurrence of unusual fatty acids: Part 3. Acetylenic fatty acids. *Nahrung* 35, 193-202
- Elble, R. (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* 13, 18-20
- Haigh, W.G. & James, A.T. *Biochim. Biophys. Acta* 137, 391-392
- Hirsinger, F. (1989). New annual oil crops. In *Oil crops of the world*, (eds. G. Röbbelen, R.K. Downey and A. Ashri), pp.518-532. Mc-Graw-Hill Inc.
- Kohn, G., Hartmann, E., Stymne, S. & Beutelmann, P. (1994) Biosynthesis of acetylenic acids in the moss *Ceratodon purpureus*. *J. Plant Physiol.* 144, 265-271

01.03.99

Langridge, J., Langridge, P and Bergquist P.L. (1980) Extraction of nucleic acids from agarose gels. Anal. Biochem. 103, 264-271

Nilsson, R. and Liljenberg, C. (1991) The determination of double bond positions in polyunsaturated fatty acids - Gaschromatography/ mass spectrometry of the diethylamide derivative. Phytochemical analysis 2, 253-259

Shanklin, J., Whittle, E. & Fox, B.G. (1994) Eight histidine residues are catalytically essential in membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. Biochemistry 33, 12787-12794.

Stymne, S. & Lenman, M. (1996) Novel plant enzyme and use thereof. Swedish patent application no. 9601236-4, 96-03-29.

Vernet, T., Dignard, D. and Thomas, D.Y. (1987) A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region. Gene 52, 225-233

Wieland, B., Feil, C., Gloria-Maercker, E., Thumm, G., Lechner, M., Bravo, J.M., Poralla, K. & Goetz, F. (1994) Genetic and biochemical analysis of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 176, 7719-7726.

van de Loo, F.J., Broun, P., Turner, S. & Somerville, C. (1995) An oleate D12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acid acyl desaturase homolog. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 6743-6747.

van de Loo, F.J., Fox, G. & Somerville, C. (1993) Unusual fatty acids. In: T.S. Moore Jr (ed.) Lipid Metabolism in Plants. CRC Press, Boca Raton, str. 105.

01.03.99

Informace o seznamu sekvencí č. 1

Je uvedeno seřazení aminokyselinových sekvencí pro delta 12 ER a plastidových desaturas, delta 15 desaturas a hydroxylas z ricinových bobů. Také je v tomto seřazení uvedena proteinová sekvence odvozená od pCrepl (crepis). Podtržené jsou tři histidinové motivy, které jsou konzervovány v non-hem obsahujících monooxygenasách.

Sekvence uvedené v tomto seřazení spolu s jejich přírůstkovými čísly jsou:

bnom6des.seq, delta 12 desaturasa z Brassica napus (L29214);

gmom6des.seq, delta 12 desaturasa z Glycine max (L29215);

atom3des.seq, delta 15 desaturasa z Arabidopsis thaliana (L22961);

bnom3des.seq, delta 15 z Brassica napus (L22963);

rcom3des.seq, delta 15 desaturasa z Ricinus communis (L25897);

siom3des.seq, delta 15 desaturasa z orientálního sesamu (U25817);

ldd15des.seq, delta 15 desaturasa z Limnanthes douglasii (U17063);

01.03.99

gsom3des, delta 15 desaturasa z Glycine max (L22965);
atom3bdes.seq, delta 15 desaturasa z Arabidopsis thaliana
(D17597);

bnom3lides.seq, delta 15 z Brassica napus (L22962);

gsom3bdes.seq, delta 15 desaturasa z Glycine max (L22964);

atd12des.seq, delta 12 desaturasa z Arabidopsis thaliana
(L26296);

gmom6bdes.seq, delta 12 desaturasa z Glycine max (L43921);

scom12des.seq, delta 12 desaturasa z S. commesonii (X92847);

gmom6ades.seq, delta 12 desaturasa z Glycine max (L43920);

rchyd.seq, oleat 12-hydroxylasa z Ricinus communis (U22378);

crepis, acetylenasa Crepis alpina podle této přihlášky.

01.03.99

Seznam sekvencí 1

	1				50
bnom6des.seq				MASRIA	DSLFAFTGPQ QCLPRAPKLA
gmom6des.seq				MACTLA	DSLLLFKGSY Q.KPVLRRDI
atom3des.seq	.MANLVLSEC	GIRPLPRIYT	TPRSNFLSNN	N...	KFRPSL SSSSYKTSSS
bnom3des.seq					
rcom3des.seq	MAAGWVLSEC	GLRPLPRIYS	RPRIGFTSKT	TNLLKLRELP	DSKSYNLCSS
siom3des.seq	.MASWVLSEC	GLRPLPRVYP	KPRTGHPLLN	SNPTKLRFSS	TDLGNGSS..
ldd15des.seq	.MASWVLSQY	ALNPLPHIFR	TPRTSITSHK	L	TVSHTNNRAT
gsom3des.seq	.MATWYHQKC	GLKPLAPVIP	RPRTGAALSS	TSRVEF....	..LDTNKVVA
atom3bdes.seq					
bnom3l1des.seq					
gsom3bdes.seq					
atd12des.seq					
gmom6bdes.seq					
scom12des.seq					
gmom6ades.seq					
rchyd.seq					
crepis					
	51				100
bnom6des.seq	SARLSPGVYA	VRPIDLLLKG	TRRTFLVPAK	KRIGCIKAVF	VPVAPPSADN
gmom6des.seq	AARYSPGIFS	LNSNGLIQKR	FRRQRNFVTR	NKVTVIHAVA	IPVQAPPVES
atom3des.seq	PLSFGLNSRD	GFTRNWALNV	STPLTTPIFE	ESP.....	LEEDNK
bnom3des.seq					
rcom3des.seq	FKVSSWSNSK	QSNWALNVAV	PVNVSTVSGE	DDREREENG	IVN.VDEGKG
siom3des.seq	...FCLSSGI	LREKNWALRV	SAPLRVLQVE	EEEEENKEGER	VIN.GGEE..
ldd15des.seq	PDLTKLSLIK	FRERKLGLRV	SAPFQIASTT	PE.....	EEDV
gsom3des.seq	GPKFQPLRCN	LRERNWGLKV	SAPLRVASIE	EEQKSVDLTN	GTNGVEHEKL
atom3bdes.seq				MVV	AMDQRTNVNG DPGAGDRKKE
bnom3l1des.seq				MVV	AMDQRSNANG D.....
gsom3bdes.seq				MV	KDTKPLAYAA NNGYQQKGSS
atd12des.seq				MGAG	GRMPVP.... TSSKKSETDT
gmom6bdes.seq				MGAG	GRTDVP.... PANRKSEVDP
scom12des.seq				MGAG	GRMSAP.... NGETEVRKRP
gmom6ades.seq				MGLAKETTMG	GRGRVA.... KVEVQGK.KP
rchyd.seq				MGGG	GRMSTVITSN NSEKKGSSSH
crepis				MGGG	GR..... ..GRTSQKPL
	101				150
bnom6des.seq	AEDREQLAES	YGFKQIGQDL	PDNVTLKDIM	DTLPKEVFEI	DDVKAWKSVL
gmom6des.seq	AEYRKQLAED	YGFRQVGEPL	SDDVTLKDVI	NPLPKEVFEI	DDVKAWKSVL
atom3des.seq	QRFDPGAPPP	FNLADIRAAI	PKHCWVKNPW	KSLSYVVRDV	AIVFA.....
bnom3des.seq				..MSYVVREL	AIVFA.....
rcom3des.seq	EFFDAGAPPP	FTLADIRAAI	PKHCWVKNPW	RSMSYVLRDV	VVVFG.....
siom3des.seq	..FDPGAPPP	FKLSDIREAI	PKHCWVKDPW	RSMGYVVRDV	AVVFG.....
ldd15des.seq	AEFDPGSPPP	FKLADIRAAI	PKHCWVKQW	RSMSYVVRDV	VIVLG.....
gsom3des.seq	PEFDPGAPPP	FNLADIRAAI	PKHCWVKDPW	RSMSYVVRDV	IAVFG.....
atom3bdes.seq	ERFDPSAQPP	FKIGDIRAAI	PKHCWVKSPL	RSMSYVVRDI	IAVAA.....
bnom3l1des.seq	ERFDPSAQPP	FKIGDIRAAI	PKHCWVKSPL	RSMSYVARDI	FAVVA.....
gsom3bdes.seq	FDFDPSAPPP	FKIAEIRASI	PKHCWVKNPW	RSLSYVLRDV	LVIAA.....
atd12des.seq	TKRVPCEKPP	FVSGDLKKAI	PPHCFKRSIP	RSFSYLISDI	IIASC.....
gmom6bdes.seq	LKRVPFEKPP	FSLSQIKKAI	PPHCFQRSVL	RSFSYVVYDL	TI AFC.....
scom12des.seq	LQKVPTSKPP	FTVGDIKKAI	PPHCFQRSIL	RSFSYVVYDL	ILVSI.....
gmom6ades.seq	LSRVPTKPP	FTVGDLKKAI	PPHCFQRSLL	TSFSYVVYDL	SFAF.....
rchyd.seq	LKRAPHTKPP	FTVGLKKAI	PPHCFERSFV	RSFSYVAYDV	CLSFL.....
crepis	MERVSVD.PP	FTVSDLKQAI	PPHCFKRSVI	RSSYYIVHDA	IIAYI.....

01.03.99

Seznam sekvencí 1 (pokračování)

	151				200
bnom6des.seq	ISVTSYALGL	FMIKAPWYL	LPLAWAWTGT	AVTGFFVIGH	DCAHKSFSKN
gmom6des.seq	ISVTSYALGL	FMISKAPWYL	LPLAWVWTGT	AITGFFVIGH	DCAHRSFSSN
atom3des.seq	LAAGAAYL..	NNWIV	WPLYWLAQGT	MFWALFVLGH	DCGHGSFSND
bnom3des.seq	LAAGAAYL..	NNWLIV	WPLYWIAQGT	MFWALFVLGH	DCGHGSFSND
rcom3des.seq	LAAVAAYF..	NNWVA	WPLYWFCQGT	MFWALFVLGH	DCGHGSFSNN
siom3des.seq	LAAVAAYF..	NNWVV	WPLYWFAQST	MFWALFVLGH	DCGHGSFSND
ldd15des.seq	LAAAATAA..	NSWAV	WPLYWVAQGT	MFWALFVLGH	DCGHGSFSNN
gsom3des.seq	LAAAAAYL..	NNWLIV	WPLYWAAQGT	MFWALFVLGH	DCGHGSFSNN
atom3bdes.seq	LAIAAVYV..	DSWFL	WPLYWAAQGT	LFWAIFVLGH	DCGHGSFSDI
bnom3ldes.seq	LAVAAYF..	DSWFF	WPLYWAAQGT	LFWAIFVLGH	DCGHGSFSDI
gsom3bdes.seq	LVAAAIHF..	DNWLL	WLIYCPIQGT	MFWALFVLGH	DCGHGSFSDS
atd12des.seq	FYYVATNYFS	LLPQPLSYLA	WPLYWACQGC	VLGTGIWVIAH	ECGHHAFSDY
gmom6bdes.seq	LYYVATHYFH	LLPGPLSFRG	MAIYWAVQGC	ILTGWVIAH	ECGHHAFSDY
scom12des.seq	MYVANTYFH	LLPSPYCYIA	WPIYWICQGC	VCTGIWVNAH	ECGHHAFSDY
gmom6ades.seq	IFYIATTYFH	LLPQPFSLIA	WPIYWVLQGC	LLTGWVIAH	ECGHHAFSKY
rchyd.seq	FYSIATNFFP	YISSPLSYVA	WLWVWLFQGC	ILTGLWVIGH	ECGHHAFSEY
crepis	FYFLADKYIP	ILPAPLAYLA	WPLYWFCQAS	ILTGLWVIGH	ECGHHAFSDY
	201				250
bnom6des.seq	KLVEDIVGTL	AFLPLVYPYE	PWRFKHDRHH	AKTNMLVHDT	AWQPVPPPEEF
gmom6des.seq	KLVEDIVGTL	AFMPLIYPYE	PWRFKHDRHH	AKTNMLREDT	AWHPVWKDEF
atom3des.seq	PKLNSVVGHL	LHSSILVPYH	GWRISHRTHH	QNHGHVENDE	SWHPMSEKIY
bnom3des.seq	PRLNSVVGHL	LHSSILVPYH	GWRISHRTHH	QNHGHVENDE	SWHPMSEKIY
rcom3des.seq	PKLNSVVGHL	LHSSILVPYH	GWRISHRTHH	QNHGHVENDE	SWHPLSEKIF
siom3des.seq	PKLNSVVGHI	LHSSILVPYH	GWRISHRTHH	QNHGHVENDE	SWHPLSEKIY
ldd15des.seq	HKLNSVVGHL	LHSSILVPYH	GWRIRHRTTH	QNHGHVENDE	SWHPMSEKLF
gsom3des.seq	SKLNSVVGHL	LHSSILVPYH	GWRISHRTHH	QNHGHVENDE	SWHPLPEKLF
atom3bdes.seq	PLLNSVVGHI	LHSFILVPYH	GWRISHRTHH	QNHGHVENDE	SWVPLPERVY
bnom3ldes.seq	PLLNTAVGHI	LHSFILVPYH	GWRISHRTHH	QNHGHVENDE	SWVPLPEKLY
gsom3bdes.seq	PLLNSLVGHI	LHSSILVPYH	GWRISHRTHH	QNHGHIEKDE	SWVPLTEKIY
atd12des.seq	QWLDDTVGLI	FHSFLLVPYF	SWKYSHRRHH	SNTGSLERDE	VFVPKQKSAI
gmom6bdes.seq	QLLDDIVGLI	LHSALLVPYF	SWKYSHRRHH	SNTGSLERDE	VFVPKQKSCI
scom12des.seq	QWVDDTVGLI	LHSALLVPYF	SWKYSHRRHH	SNTGSLERDE	VFVPKPKSQL
gmom6ades.seq	QWVDDVVGLT	LHSTLLVPYF	SWKISHRRHH	SNTGSLDRDE	VFVPKPKSKV
rchyd.seq	QLADDIVGLI	VHSALLVPYF	SWKYSHRRHH	SNIGSLERDE	VFVPKSKSKI
crepis	QWVDDTVGFI	LHSFILMTPYF	SWKYSHRNHH	ANTNSLDNDE	VYIPKSKAKV
	251				300
bnom6des.seq	DS.....	.SPVLRKAI	FGYGPIRPWL	SI.....AH	WVNWHFNLRK
gmom6des.seq	ES.....	.TPLLRKAI	YGYGPFRCWM	SI.....AH	WLMWHFDLKK
atom3des.seq	NTLDK....	PTRFFRFTLP	LVMLAYPFYL	WARSPGKK..	..GSHYHPDS
bnom3des.seq	KSLDK....	PTRFFRFTLP	LVMLAYPFYL	WARSPGKK..	..GSHYHPDS
rcom3des.seq	KSLDN....	VTKTLRFSLP	FPMLAYPFYL	WSRSPGKK..	..GSHFHPDS
siom3des.seq	KNLDT....	ATKKLRFTLP	FPLLAYPIYL	WSRSPGKQ..	..GSHFHPDS
ldd15des.seq	RSLDK....	IATFRFKAP	FPMLAYPFYL	WERSPGKT..	..GSHYHPDS
gsom3des.seq	RSLDT....	VTRMLRFTAP	FPLLAFPVYL	FSTRSPGKT..	..GSHFDPSS
atom3bdes.seq	KKLPH....	STRMLRYTVP	LPMLAYPLYL	CYRSPGKE..	..GSHFNPPS
bnom3ldes.seq	KNLSH....	STRMLRYTVP	LPMLAYPLYL	WYRSPGKE..	..GSHYNPPS
gsom3bdes.seq	KNLDS....	MTRLIRFTVP	FPLFVYPIYL	FSTRSPGKE..	..GSHFNPPS
atd12des.seq	KWYGKYLNNP	LGRIMMLTVQ	F.VLGWPLYL	AFNVSGRPYD	GFACHFFPNA
gmom6bdes.seq	KWYSKYLNNP	PGRVLTAVT	L.TLGWPLYL	ALNVSGRPYD	RFACHYDPYG
scom12des.seq	GWYSKYLNNP	PGRVLSLTIT	L.TLGWPLYL	AFNVSGRPYD	RFACHYDPYG
gmom6ades.seq	AWFSKYLNNP	LGRAVSLTIT	L.TIGWPMYL	AFNVSGRPYD	SFASHYHPYA
rchyd.seq	SWYSKYNNP	PGRVLTAAAT	L.LLGWPLYL	AFNVSGRPYD	RFACHYDPYG
crepis	ALYYKVLNHP	PGRLLIMFIT	F.TLGEPLYL	FTNISGKKYE	RFANHFDPMS

Seznam sekvencí 1 (pokračování)

	301		350
bnom6des.seq	..FRPSEVNR VKISLACVFA FMAVGWPLII YKVGVLGWVK FWLMPWLGYH		
gmom6des.seq	..FRPSEVPR VKISLACVFA FIAIGWPLII YKTGIMGWIK FWLMPWLGYH		
atom3des.seq	DLFLPKERKD VLTSTACWTA .MAALLVCLN FTIGPIQMLK LYGIPYWINV		
bnom3des.seq	DLFLPKERNR VLTSTACWTA .MAVLLVCLN FVMGPMQMLK LYVIPYWINV		
rcom3des.seq	GLFVPKERKD IITSTACWTA .MAALLVYLN FSMGPVQMLK LYGIPYWIFV		
siom3des.seq	DLFVPNEKKD VITSTVCWTA .MLALLVGLS FVIGPVQLLK LYGIPYLGNV		
ldd15des.seq	DLFVPSEKKD VITSTICWTT .MVGLLIGLS FVMGPIQILK LYVVPYWIFV		
gsom3des.seq	DLFVPNERKD VITSTACWAA .MLGLLVGLG FVMGPIQLLK LYGVVPYVIFV		
atom3bdes.seq	SLFAPSERKL IATSTTCWSI .MFVSLIALS FVFGPLAVLK VYGVPIYIFV		
bnom3lides.seq	SLFAPSERKL IATSTTCWSI .MLATLVYLS FLVGPVTVLK VYGVPIYIFV		
gsom3bdes.seq	NLFPPSERKG IAISTLCWAT .MFSLLIYLS FITSPLLVLK LYGIPYWIFV		
atdl2des.seq	PIYNDRERLQ IYLS DAGILA .VCFGLYRYA AAQGMASMIC LYGVPLLIIVN		
gmom6bdes.seq	PIYSDRERLQ IYIS DAGILA .VVYGLFRLA MAKGLAWVVC VYGVPLLIIVN		
scom12des.seq	PIYNNRERLQ IFIS DAGVLG .VCYLLYRIA LVKGLAWLVC VYGVPLLIIVN		
gmom6ades.seq	PIYSNRERLL IYVSDVALFS .VTYSLYRVA TLKGLVWLLC VYGVPLLIIVN		
rchyd.seq	PIFSENERLQ IYIADLGIFA .TTFVLYQAT MAKGLAWVMR IYGVPLLIIVN		
crepis	PIFKERERFQ VLLSDLGLLA .VLYGVKLAV AAKGAAWVTC IYGIPVLGVF		
	351		400
bnom6des.seq	FWMSTFTMVH HTAPH..IPF KPADEWNAAQ AQLNGTVHCD YPSWIEILCH		
gmom6des.seq	FWMSTFTMVH HTAPY..IPF KYSEEWNAQ AQLNGTVHCD YPKWIEILCH		
atom3des.seq	MWLDFVTYLH HHGHEDKLPW YRGKEWSYLR GGL.TTLDRD YGLINNIHHD		
bnom3des.seq	MWLDFVTYLH HHGHEDKLPW YRGKEWSYLR GGL.TTLDRD YGLINNIHHD		
rcom3des.seq	MWLDFVTYLH HHGHEDKLPW YRGKAWSYLR GGL.TTLDRD YGWINNIHHD		
siom3des.seq	MWLDLVTYLH HHGHEDKLPW YRGKEWSYLR GGL.TTLDRD YGWINNIHHD		
ldd15des.seq	MWLDFVTYLD HHGHEDKLPW YRGKEWSYLR GGL.TTLDRD YGLINNIHHD		
gsom3des.seq	MWLDLVTYLH HHGHEDKLPW YRGKEWSYLR GGL.TTLDRD YGWINNIHHD		
atom3bdes.seq	MWLDAVTYLH HHGHDEKLPW YRGKEWSYLR GGL.TTIDRD YGIFNNIHHD		
bnom3lides.seq	MWLDAVTYLH HHGHDDKLPW YRGKEWSYLR GGL.TTIDRD YGIFNNIHHD		
gsom3bdes.seq	MWLDFVTYLH HHGHHQKLPW YRGKEWSYLR GGL.TTVDRD YGWIYNIHHD		
atdl2des.seq	AFLVLITYLQ H..THPSLPH YDSSEWDWLR GAL.ATVDRD YGILNKVFHN		
gmom6bdes.seq	GFLVLITFLQ H..THPALPH YTSSEWDWLR GAL.ATVDRD YGILNKVFHN		
scom12des.seq	GFLVLITYLQ H..THPSLPH YDSTEWDWLR GAL.ATCDRD YGVLNKVFHN		
gmom6ades.seq	GFLVTITYLQ H..THFALPH YDSSEWDWLR GAL.ATMDRD YGILNKVFHN		
rchyd.seq	CFLVMITYLQ H..THPAIPR YGSSEWDWLR GAM.VTVDRD YGVLNKVFHN		
crepis	IFFDIITYLH H..THLSLPH YDSSEWNWLR GAL.STIDRD FGFLNSVLHD		
	401		450
bnom6des.seq	DINVHIPHHI SPRIPSYNLR AAHQSIQENW GKYTNLATWN WRLMKTIMTV		
gmom6des.seq	DINVHIPHHI SPRIPSYNLR AAHKSQENW GQYLNEASWN WRLMKTIMTV		
atom3des.seq	I.GTHVIHHL FPQIPHYHLV EATEAAKPVL GKYYREPKDS .GPLPLHLL		
bnom3des.seq	I.GTHVIHHL FPQIPHYHLV EATEAAKPVL GKYYREPKDS .GPLPLHLLG		
rcom3des.seq	I.GTHVIHHL FPQIPHYHLV EATEAAKPMV GKYYREPKKS .GPLPLHLLG		
siom3des.seq	I.GTHVIHHL FPQIPHYHLV EATEAAKPVL GKYYREPKKS .APLPFHLLG		
ldd15des.seq	I.GTHVIHHL FPQIPHYHLV EATQAAPIF GKYYKEPAKS .KPLPFHLID		
gsom3des.seq	I.GTHVIHHL FPQIPHYHLV EATEAAKPVF GKYYREPKKS AAPLPFHLIG		
atom3bdes.seq	I.GTHVIHHL FPQIPHYHLV DATKAACHVL GRYREPKTS .GAIPHLVE		
bnom3lides.seq	I.GTHVIHHL FPQIPHYHLV DATKSAHVL GRYREPKTS .GAIPHLVE		
gsom3bdes.seq	I.GTHVIHHL FPQIPHYHLV EATQAAPVL GDYYREPERS .APLPFHLIK		
atdl2des.seq	ITDTHVAHHL FSTMPHYNAM EATKAIPIL GDYYQFDGTPWYV		
gmom6bdes.seq	ITDTHVAHHL FSTMPHYHAM EATKAIPIL GEYYRFDETFVK		
scom12des.seq	ITDTHVHHL FSTMPHYNAM EATKAVKPLL GDYYQFDGTPIYK		
gmom6ades.seq	ITDTHVAHHL FSTMPHYHAM EATNAIPIL GEYYQFDDTPFYK		
rchyd.seq	IADTHVAHHL FATVPHYHAM EATKAIPIM GEYYRYDGTFYK		
crepis	VTHTHVMHHL FSYIPHYHAK EARDAINTVL GDFYKIDRTILK		

01.03.99

Seznam sekvencí 1 (pokračování)

	451			493
bnom6des.seq	CHVYDKEENY	IPFDRLAPEE	SQPITFLKKA	MPDYAA.... ...
gmom6des.seq	CQVYDKEKSL	CCLRRTCP..		
atom3des.seq	ILAKSIKEDH	YV.....SDE	GEVVYYKADP	NLYGEVKVRA D..
bnom3des.seq	ILAKSIKEDH	FV.....SDE	GDVVYYEADP	NLYGEIKVTA E..
rcom3des.seq	SLVRSMKEDH	YV.....SDT	GDVVYYQKDP	KLSGIGGEKT E..
siom3des.seq	DLTRSLKRDH	YV.....SDV	GDVVYYQTD	QLTGAEKS.. ...
ldd15des.seq	VLLKSLKRDH	FV.....PDT	GDIVYYQSDP	QISGSLKPE. ...
gsom3des.seq	EIIRSFKTDH	FV.....SDT	GDVVYYQTDS	KINGSSKLE. ...
atom3bdes.seq	SLVASIKKDH	YV.....SDT	GDIVFYETDP	DLYVYASDKS KIN
bnom31des.seq	SLVASIKKDH	YV.....SDT	GDIVFYETDP	DLYVYASDKS KIN
gsom3bdes.seq	YLIQSMRQDH	FV.....SDT	GDVVYYQTDS	LLLHSQRD.. ...
atd12des.seq	AMYREAKECI	YVEPDREGDK	KGVYWYNNKL	
gmom6bdes.seq	AMWREARECI	YVEPDQSTES	KGVFWYNNKL	
scom12des.seq	EMWREAKECL	YVEKDESSQG	KGVFWYNNKL	
gmom6ades.seq	ALWREARECL	YVEPDDEGTSE	KGVYWYRNKY	
rhyd.seq	ALWREAKECL	FVEPDDEGAPT	QGVFWYRNKY	
crepis	AMWREAKECI	FIEPEKGRES	KGVYWY.NKF	

01.03.99

Seznam sekvencí 2

Nukleotidová sekvence a odvozená aminokyselinová sekvence
otevřeného čtecího rámečku z plasmidu pCrep1.

```

ATGGGTGGCGGTGGCCGTGGTCCGACTTCGCAAAAACCCCTCATGGAACGTGTCTCAGTT
M G G G G R G R T S Q K P L M E R V S V

GATCCACCCTTCACCGTGAGTGATCTCAAGCAAGCAATCCCTCCCCATTGCTTCAAGCGA
D P P F T V S D L K Q A I P P H C F K R

TCTGTAATCCGTTCTCTTACTACATAGTCCACGATGCTATTATCGCCTACATCTTCTAC
S V I R S S Y Y I V H D A I I A Y I F Y

TTCCTTGCCGACAAATACATTCCGATTCTCCCTGCCCCCTTAGCCTACCTCGCTTGGCCC
F L A D K Y I P I L P A P L A Y L A W P

CTTTACTGGTTCTGTCAAGCTAGCATCCTCACC GGCTTATGGGTCATCGGTCACGAATGC
L Y W F C Q A S I L T G L W V I G H E C

GGTCACCATGCCTTCAGCGACTACCAAGTGGGTTGACGACACTGTGGGCTTCATCCTCCAC
G H H A F S D Y Q W V D D T V G F I L H

TCGTTTCTCATGACCCCGTATTTCTCCTGGAAATACAGCCACCGGAACCACCATGCCAAC
S F L M T P Y F S W K Y S H R N H H A N

ACAAATTTCGCTTGACAACGATGAAGTTTACATCCCCAAAAGCAAGGCCAAAGTCGCGCTT
T N S L D N D E V Y I P K S K A K V A L

TACTATAAAGTTCTCAACCACCCACCTGGCCGACTGTTGATTATGTTTCATCACCTTCACC
Y Y K V L N H P P G R L L I M F I T F T

CTAGGCTTCCCTCTATACCTCTTTACCAATATTTCCGGCAAGAAGTATGAAAGGTTTGCC
L G F P L Y L F T N I S G K K Y E R F A

AACCATTTCGACCCCATGAGTCCGATTTTCAAAGAGCGTGAGCGGTTTCAGGTCTTGCTA
N H F D P M S P I F K E R E R F Q V L L

TCGGATCTTGGCCTTCTTGCTGTGCTTTACGGAGTTAAACTTGCGGTAGCAGCGAAAGGC
S D L G L L A V L Y G V K L A V A A K G

GCCGCCTGGGTGACGTGCATTTACGGAATTCCAGTTTTAGGCGTGTTTATCTTTTTTCGAT
A A W V T C I Y G I P V L G V F I F F D

ATCATCACCTACTTGCACCACACCCATCTGTCGTTGCCTCATTATGATTCATCTGAATGG
I I T Y L H H T H L S L P H Y D S S E W

AACTGGCTCAGAGGGGCTTTGTCAACAATCGATAGGGACTTTGGGTTCTGAATAGTGTG
N W L R G A L S T I D R D F G F L N S V

CTCCATGATGTTACACACACTCACGTTATGCATCATCTGTTTTTCATACATTCCACACTAT
L H D V T H T H V M H H L F S Y I P H Y

CATGCGAAGGAGGCAAGGGATGCAATCAACACAGTCTTGGGCGACTTTTATAAGATCGAT
H A K E A R D A I N T V L G D F Y K I D

AGGACTCCAATTCTGAAAGCAATGTGGAGAGAGGCCAAGGAATGCATCTTCATCGAGCCT
R T P I L K A M W R E A K E C I F I E P

GAAAAAGGTAGGGAGTCCAAGGGTGTATATTGGTACAATAAATCTGA
E K G R E S K G V Y W Y N K F *

```

01.03.99

jakékoliv nukleotidové sekvence, které jsou v podstatě homologní k této sekvenci.

8. Použití cDNA podle jakéhokoliv z nároků 5, 6 nebo 7 pro transformaci organismů.

9. Použití podle nároku 8, kde organismus je schopen akumulace acetylenových sloučenin.

10. Použití podle nároku 8, kde organismy jsou organismy akumulující oleje.

11. Použití podle nároku 10, kde jsou organismy akumulující oleje vybrané ze skupiny skládající se z olejnatých plodin, oleogenních kvasinek a plísň.

12. Organismy transformované acetylenasovou cDNA podle jakéhokoliv z nároků 5, 6 nebo 7.

13. Organismy podle nároku 12, které jsou organismy akumulující acetylenové sloučeniny.

14. Organismy podle nároku 12, které jsou organismy akumulující oleje.

15. Organismy podle nároku 14, které jsou vybrány ze skupiny skládající se z olejnatých plodin, oleogenních kvasinek a plísň.

16. Acetylenové sloučeniny akumulované v organismech podle nároku 13.

01.03.99

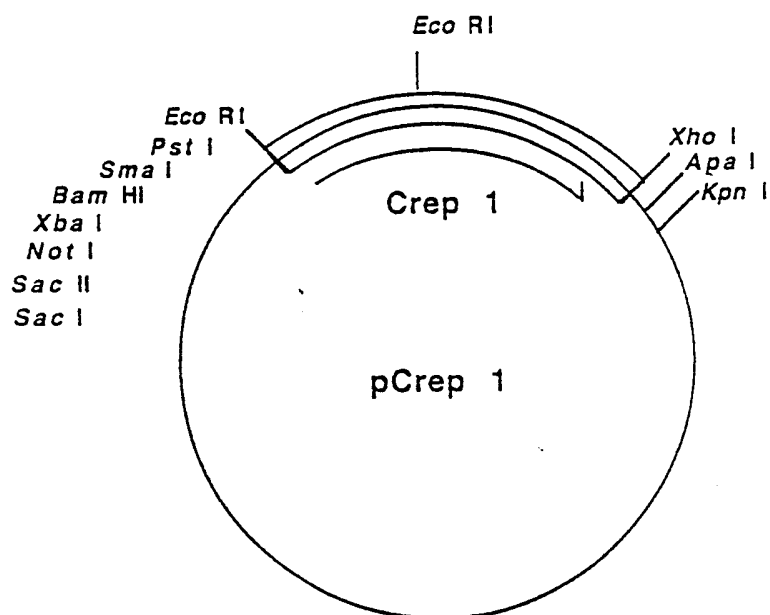
17. Oleje z organismů akumulujících oleje podle nároků 14 nebo
15.

Patentové nároky

1. Způsob pro produkci acetylenových sloučenin
v y z n a č u j í c í s e t í m, že dvojná vazba je přeměněna
na acetylenovou vazbu působením acetylenasy.
2. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m,
že acetylenové mastné kyseliny jsou produkovány přeměnou
nenasycených mastných kyselin na acetylenové mastné kyseliny,
která je způsobena acetylenasou mastných kyselin.
3. Způsob podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m,
že C18 mastné kyseliny s dvojnými vazbami v pozici delta 12 jsou
přeměněny na 12-inové kyseliny.
4. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m,
že kyselina linolová je přeměněna na 9-oktadecen-12-inovou
kyselinu, tedy krepeninovou kyselinu, pomocí delta 12 acetylenasy
z *Crepis alpina*.
5. cDNA kodující acetylenasu monooxygenasového typu se
smíšenou funkcí obsahující tři konzervované histidinové motivy
(HX_(3 nebo 4)H, HX_(2 nebo 3)HH a HX_(2 nebo 3)HH) podle seznamu
sekvencí 1.
6. cDNA podle nároku 5 kodující acetylenasu mastných kyselin.
7. cDNA podle nároku 6 kodující delta 12 acetylenasu *Crepis
alpina* obsahující sekvenci podle seznamu sekvencí 2 nebo

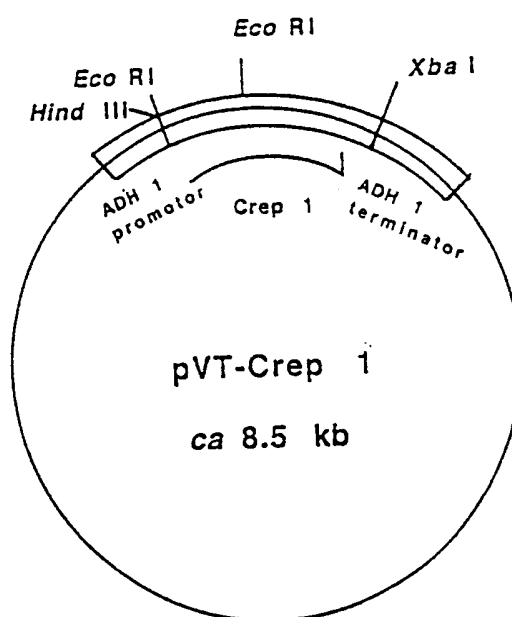
01.03.99

Obr. 1

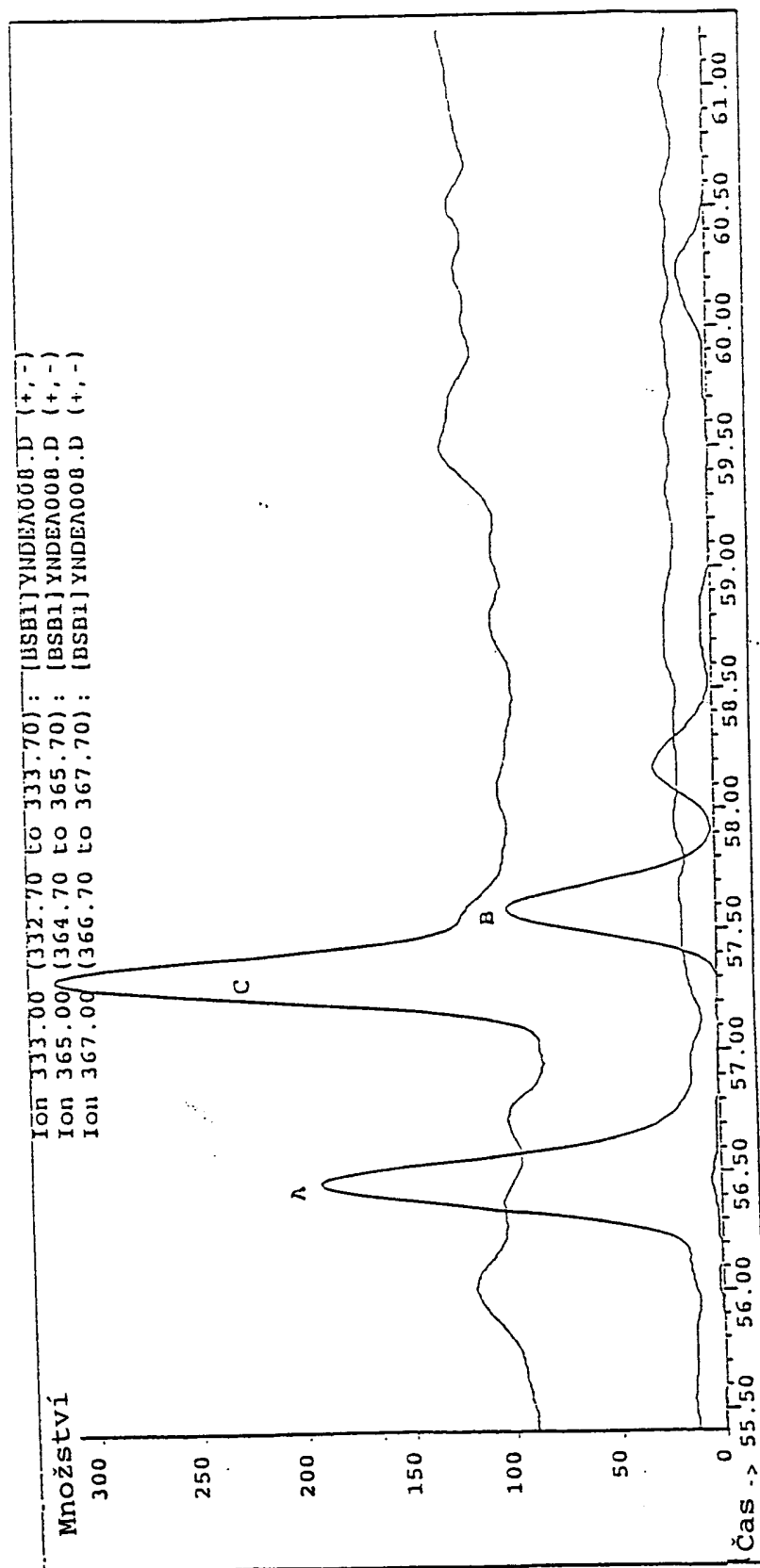


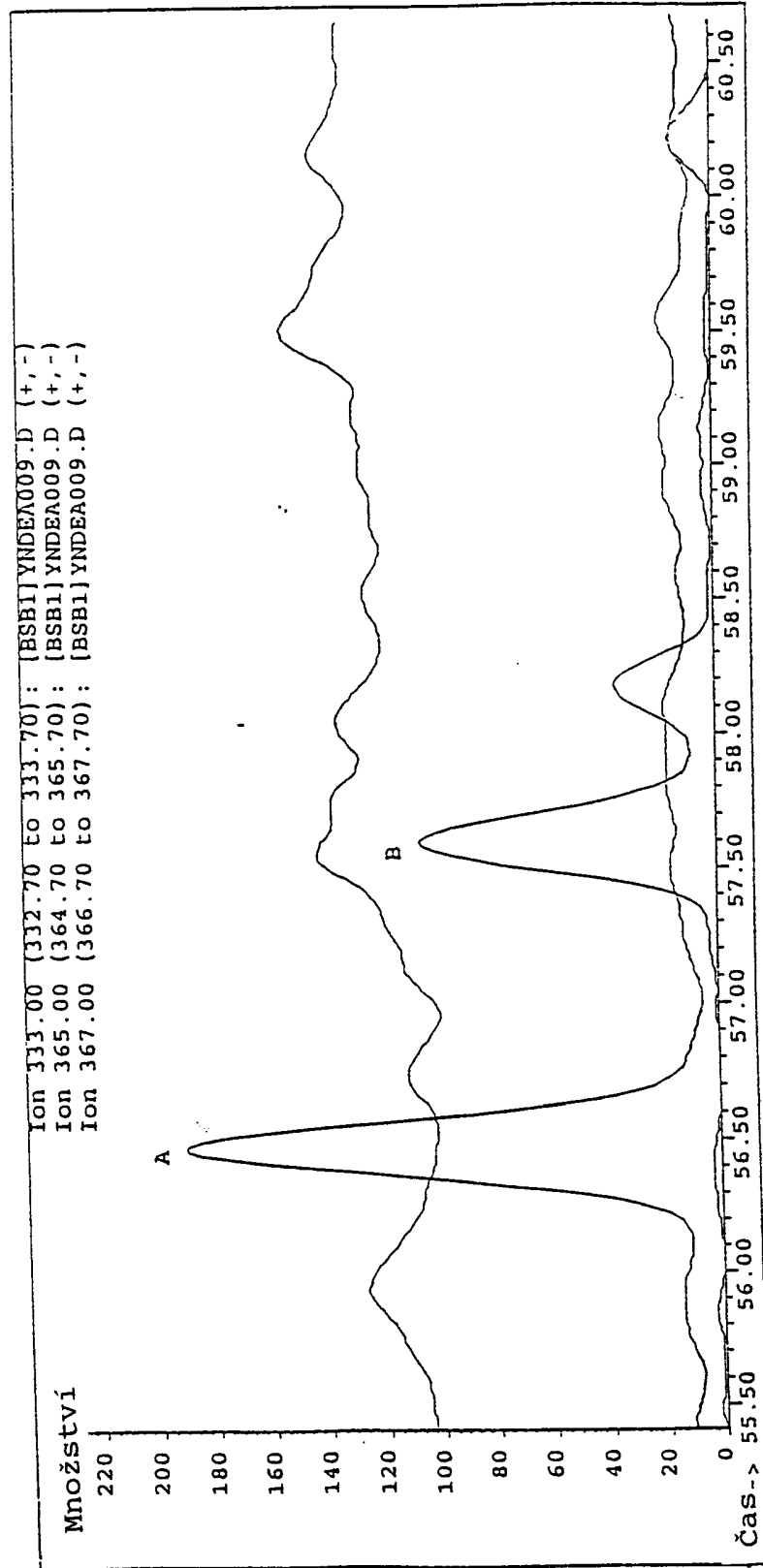
01.03.99

Obr. 2

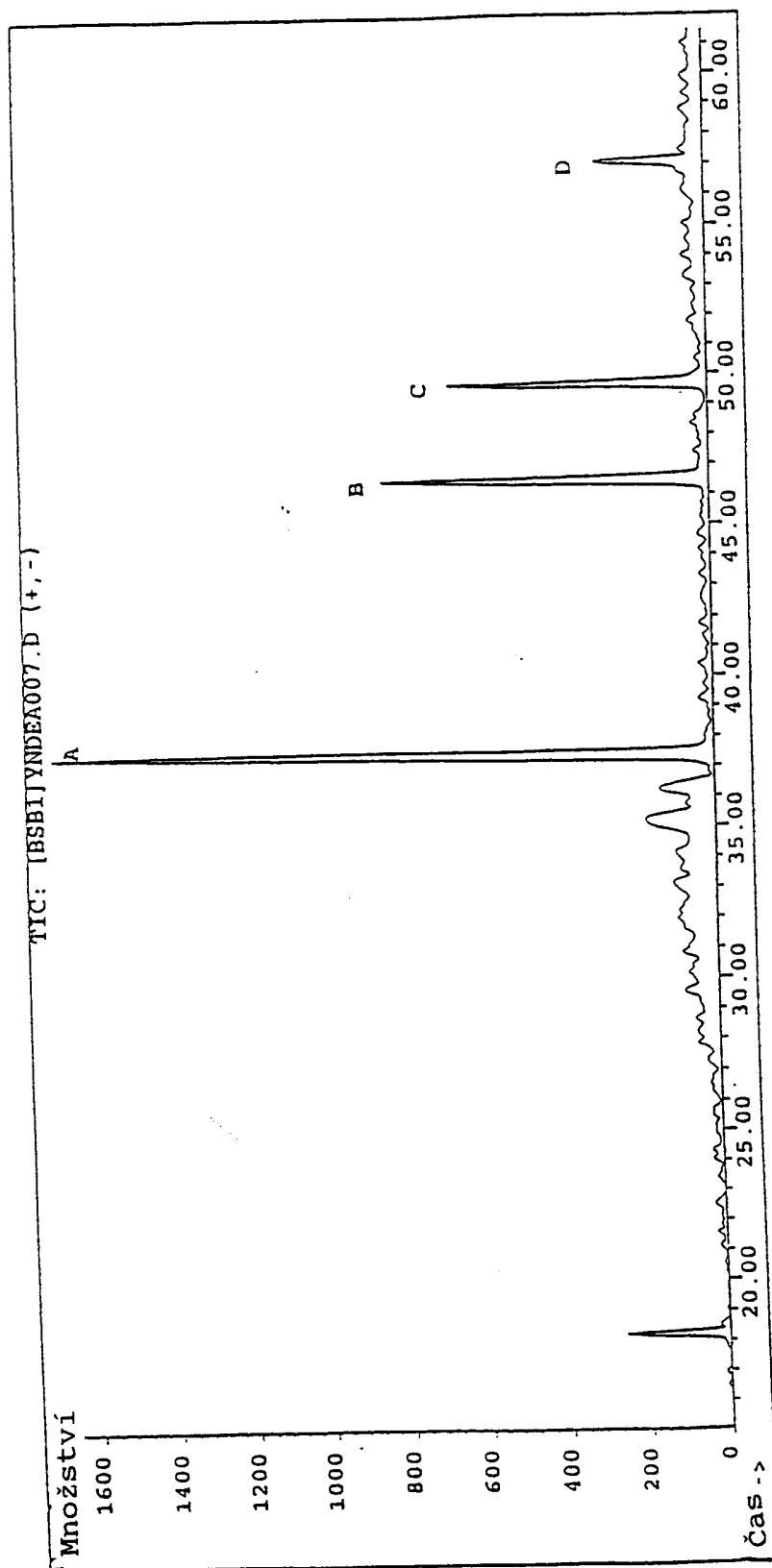


01.03.99



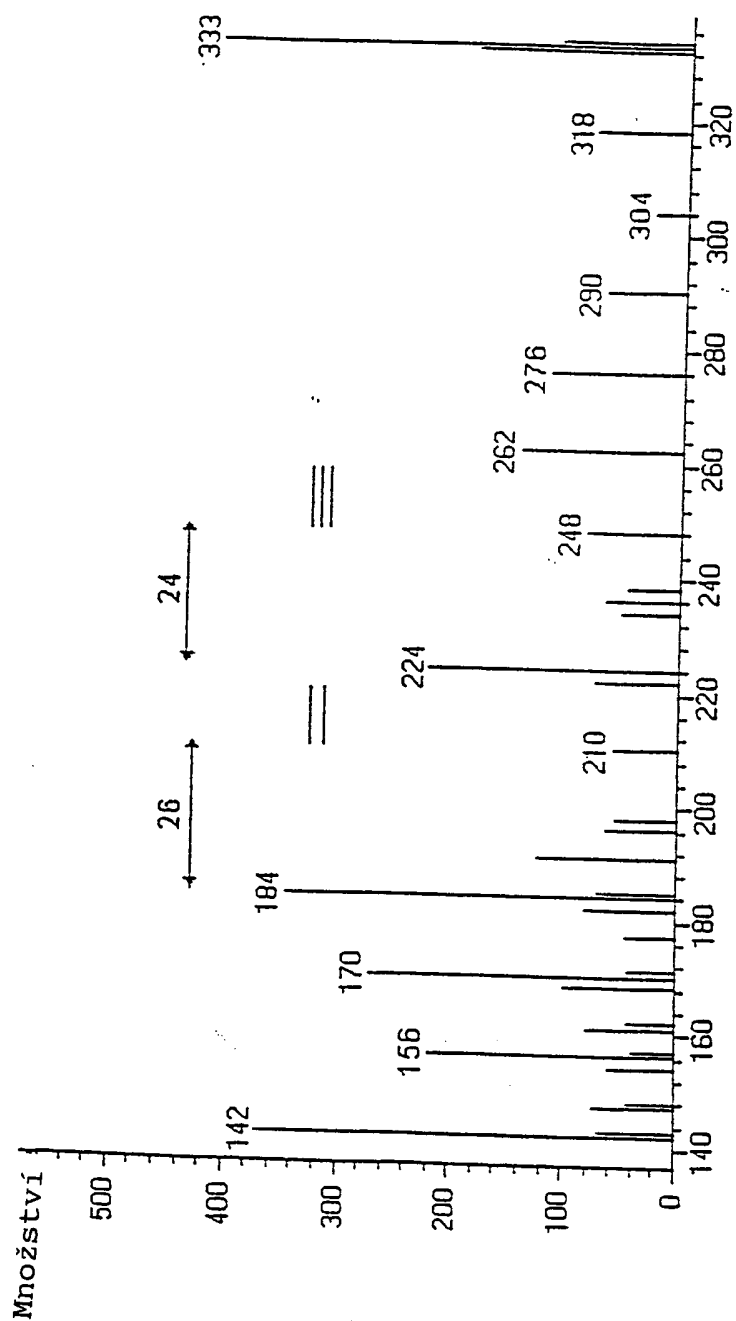


01.03.99



Obr. 5

01.03.99



Obr. 6