

(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  
20. November 2003 (20.11.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/095655 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82

(74) Anwalt: PRESSLER, Uwe; BASF Aktiengesellschaft,  
67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/04711

(22) Internationales Anmeldedatum:  
6. Mai 2003 (06.05.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 20 753.4 8. Mai 2002 (08.05.2002) DE  
102 26 413.9 13. Juni 2002 (13.06.2002) DE

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

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RENZ, Andreas  
[DE/DE]; Heinrich-von-Kleist-Str.6, 67117 Limburgerhof  
(DE). BAUER, Jörg [DE/DE]; Friedrich-Profit-Str.56,  
67063 Ludwigshafen (DE). STITT NIGEL, Marc  
[GB/DE]; Grosse Weinmeisterstr. 22a, 14469 Potsdam  
(DE). ZRENNER, Rita, Maria [DE/DE]; Storchenhof 6,  
14476 Golm (DE). GEIGENBERGER, Peter [DE/DE];  
Quantzstr. 12, 14129 Berlin (DE). VIGEOLAS, Helene  
[FR/DE]; Am alten Mörtelwerk 14, 14469 Potsdam (DE).

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

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, 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).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-  
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

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

(54) Title: METHODS FOR INCREASING OIL CONTENT IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ERHÖHEN DES ÖLGEHALTES IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to methods for increasing the oil content in plants, preferably in the seeds of plants, by expres-  
sion of glycerol-3-phosphatdehydrogenases (G3PDH) from yeast, preferably from *Saccharomyces cerevisiae*. The invention also  
relates to expression constructs for the expression of G3PDH yeast in plants, preferably in the seeds of plants, transgenic plants  
expressing G3PDH, and to the use of said transgenic plants in the production of foodstuffs, feed, seeds, pharmaceuticals or fine  
chemicals, especially in the production of oils.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zum Erhöhen des Ölgehaltes in Pflanzen, bevorzugt in pflanzlichen Sa-  
men, durch Expression von Glycerol-3-phosphatdehydrogenasen (G3PDH) aus Hefen, bevorzugt aus *Saccharomyces cerevisiae*.  
Die Erfindung betrifft ferner Expressionskonstrukte zur Expression von Hefe G3PDH in Pflanzen, bevorzugt in pflanzlichen Samen,  
transgene Pflanzen exprimierend Hefe G3PDH, sowie die Verwendung von besagter transgener Pflanzen zur Herstellung von Nah-  
rungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, insbesondere zur Herstellung von Ölen.



WO 03/095655 A2

## Verfahren zum Erhöhen des Ölgehaltes in Pflanzen

## Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zum Erhöhen des Ölgehaltes in Pflanzen, bevorzugt in pflanzlichen Samen, durch Expression von Glycerol-3-phosphatdehydrogenasen (G3PDH) aus Hefen, bevorzugt aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Erfindung betrifft ferner

- 10 Expressionskonstrukte zur Expression von Hefe G3PDH in Pflanzen, bevorzugt in pflanzlichen Samen, transgene Pflanzen exprimierend Hefe G3PDH, sowie die Verwendung von besagter transgener Pflanzen zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, insbesondere zur Herstellung von
- 15 Ölen.

Die Erhöhung des Ölgehalts in Pflanzen und insbesondere in Pflanzensamen ist für die klassische wie für die modernen Pflanzenzüchtung und insbesondere die pflanzliche Biotechnologie

20 von großem Interessen. Bedingt durch den steigenden Verbrauch von Pflanzenölen für Ernährung bzw. industrielle Anwendungen sind Möglichkeiten zur Steigerung bzw. Modifikation von Pflanzenölen zunehmend Gegenstand aktueller Forschung (z.B. Töpfer et al. (1995) Science 268:681-686). Ziel ist dabei insbesondere die

25 Erhöhung des Gehaltes an Fettsäuren in Samenölen.

Auch die aus den pflanzlichen Ölen erhältlichen Fettsäuren sind von besonderem Interesse. Sie kommen beispielsweise als Grundstoffe für Weichmacher, Schmierstoffe, Tenside, Kosmetika usw.

30 zum Einsatz oder werden in der Lebens- und Futtermittelindustrie als wertvoll Grundstoffe eingesetzt. So ist beispielsweise die Bereitstellung von Rapsölen mit Fettsäuren mittlerer Kettenlänge von besonderem Interesse, da diese besonderes in der Tensidherstellung begehrt sind.

35

Durch die gezielte Modulation pflanzlicher Stoffwechselwege mittels gentechnische Verfahren kann der pflanzlichen Metabolismus in einer Weise vorteilhaft verändert werden, die durch klassische Züchtungsmethoden nur über langwierige Schritte bzw.

40 überhaupt nicht zu erreichen wären. So werden ungewöhnliche Fettsäuren, beispielsweise bestimmte polyungesättigte Fettsäuren, nur in bestimmten Pflanzen bzw. überhaupt nicht in Pflanzen synthetisiert und können deshalb nur durch Expression des entsprechenden Enzyms in transgenen Pflanzen hergestellt werden

45 (z.B. Millar et al. (2000) Trends Plant Sci 5:95-101).

## 2

- Triacylglyceride und andere Lipide werden aus Fettsäuren synthetisiert. Die Fettsäure- und Triacylglyceridbiosynthese lassen sich aufgrund der Kompartimentierung als getrennte Biosynthesewege, jedoch im Hinblick auf das Endprodukt, als ein Biosyntheseweg ansehen. Die Lipidsynthese kann dabei in zwei Teilmechanismen unterteilt werden, einen quasi "prokaryotischen" und einen quasi "eukaryotischen" (Browse et al. (1986) *Biochemical J* 235:25-31; Ohlrogge & Browse (1995) *Plant Cell* 7:957-970). Der prokaryotische Mechanismus ist in den Plastiden lokalisiert und umfasst die Biosynthese der freien Fettsäuren, die in das Cytosol exportiert werden, wo sie als Fettsäureacyl-CoA-Ester in den eukaryotischen Mechanismus eingehen und mit Glycerin-3-phosphat (G3P) zu Phosphatidsäure (PA) verestert werden. PA ist der Ausgangspunkt für die Synthese von neutralen und polaren Lipiden.
- Die neutralen Lipide werden dabei über den Kennedy-Weg am Endoplasmatischen Reticulum synthetisiert (Voelker (1996) *Genetic Engineering*, Setlow (ed.) 18:111-113; Shankline & Cahoon (1998) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:611-649; Frentzen (1998) *Lipids* 100:161-166). Neben der Biosynthese Triacylglyceriden dient G3P auch der Synthese von Glycerol (z.B. zur Osmoregulation und gegen Kältestress).

- Das für die Synthese wesentliche G3P wird dabei durch Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) mittels der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (G3PDH), auch als Dihydroxyacetonphosphatreduktase bezeichnet, synthetisiert. Dabei fungiert in der Regel NADH als reduzierendes Cosubstrat (EC 1.1.1.8). Eine weitere Klasse von Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenasen (EC 1.1.99.5) verwendet FAD als Cosubstrat. Die Enzyme dieser Klasse katalysieren die Reaktion von DHAP zu G3P. In eukaryontischen Zellen sind die beiden Enzymklassen in unterschiedlichen Kompartimenten verteilt, wobei die NAD-abhängigen cytosolisch und die FAD-abhängigen mitochondriell lokalisiert sind (für *Saccharomyces cerevisiae* siehe z.B. Larsson et al., 1998, *Yeast* 14:347-357).
- EP-A 0 353 049 beschreibt eine NAD-unabhängige G3PDH aus *Bacillus* sp. Auch in *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine NAD-unabhängige G3PDH identifiziert (Miyata K, Nagahisa M (1969) *Plant Cell Physiol* 10(3):635-643).
- G3PDH ist ein essentielles Enzym in Prokaryoten und Eukaryoten, das neben der Funktion in der Lipidbiosynthese auch für die Aufrechterhaltung des zellulären Redoxstatus durch den Einfluss auf das NAD<sup>+</sup>/NADH Verhältnis mitverantwortlich ist. Die Deletion des GPD2 Gens in *Saccharomyces cerevisiae* (eine von zwei Isoformen der G3PDH in dieser Hefe) hat ein vermindertes Wachstum unter anaeroben Bedingungen zur Folge. Darüber hinaus scheint die G3PDH eine Rolle in der Stressantwort der Hefe v.a. gegen osmotischen

## 3

Stress zu spielen. Die Deletion des GPD1 Gens bedingt in *Saccharomyces cerevisiae* eine Hypersensitivität gegen Salz.

- Sequenzen für G3PDHs wurden beschrieben für Insekten (*Drosophila melanogaster*, *Drosophila virilis*), Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Cuphea lanceolata*), Säugern (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Sus scrofa*, *Rattus norvegicus*), Fischen (*Salmo salar*, *Osmerus mordax*), Vögeln (*Ovis aries*), Amphibien (*Xenopus laevis*), Nematoden (*Caenorhabditis elegans*), Algen und Bakterien.
- 10 Pflanzliche Zellen weisen mindestens zwei Isoformen der G3PDH auf, eine cytoplasmatische und eine plastidäre (Gee RW et al. (1988) *Plant Physiol* 86:98-103; Gee RW et al. (1988) *Plant Physiol* 87:379-383). Die enzymatische Aktivität der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase wurde bei Pflanzen erstmals in Kartoffelknollen festgestellt (Santora GT et al. (1979) *Arch Biochem Biophys* 196:403-411). Weitere zytosolisch und plastidär lokalisierte G3PDH Aktivitäten wurden in anderen Pflanzen wie Erbse, Mais oder Soja detektiert (Gee RW et al. (1988) *PLANT PHYSIOL* 86(1): 20 98-103). Beschrieben sind ferner G3PDHs aus Algen wie z.B. zwei plastidäre und einer zytosolische G3PDH-Isoform aus *Dunaliella tertiolecta* (Gee R et al. (1993) *Plant Physiol* 103(1):243-249; Gee R et al. (1989) *PLANT PHYSIOL* 91(1):345-351). Für die pflanzliche G3PDH aus *Cuphea lanceolata* wurde vorgeschlagen, durch 25 Überexpression in Pflanzen eine Erhöhung des Ölgehaltes oder eine Verschiebung im Fettsäuremuster zu erreichen (WO 95/06733). Entsprechende Effekte konnten jedoch nicht belegt werden.

- Bakterielle G3PDHs und ihre Funktion sind beschrieben (Hsu und 30 Fox (1970) *J Bacteriol* 103:410-416; Bell (1974) *J Bacterial* 117:1065-1076).

- WO 01/21820 beschreibt die heterologe Expression einer mutierten *E. coli* G3PDH für erhöhte Stresstoleranz und Änderung der Fettsäurezusammensetzung in Speicherölen. Die mutierte *E. coli* G3PDH (gpsA2FR) weist einen einzelnen Aminosäureaustausch auf, der eine veränderte Inhibition durch G3P bedingt. Die heterologe Expression der gpsA2FR Mutante führt zu Glycerolipiden mit einem erhöhten Anteil an C16-Fettsäuren und einem einhergehenden verminderten Anteil an C18-Fettsäuren. Die Veränderungen im Fettsäuremuster sind relativ gering: Ein Anstieg von 2 bis 5 % an 16:0 Fettsäuren und 1,5 bis 3,5 % bei 16:3 Fettsäuren, sowie eine Verminderung an 18:2 und 18:3 Fettsäuren um 2 bis 5 % wurde beobachtet. Der Gesamtgehalt als Glycerolipiden blieb 45 unbeeinflusst.

## 4

Beschrieben sind ferner G3PDH aus Hefen (Ascomyceten) wie

- 5 a) *Schizosaccharomyces pombe* (Pidoux AL et al. (1990) *Nucleic Acids Res* 18 (23): 7145; GenBank Acc.-No.: X56162; Ohmiya R et al. (1995) *Mol Microbiol* 18(5):963-73; GenBank Acc.-No.: D50796, D50797),
- b) *Yarrowia lipolytica* (GenBank Acc.-No.: AJ250328)
- 10 c) *Zygosaccharomyces rouxii* (Iwaki T et al. *Yeast* (2001) 18(8):737-44; GenBank Acc.-No: AB047394, AB047395, AB047397) oder
- 15 d) *Saccharomyces cerevisiae* (Albertyn J et al. (1994) *Mol Cell Biol* 14(6):4135-44; Albertyn J et al. (1992) *FEBS LETT* 308(2):130-132; Merkel JR et al. (1982) *Anal Biochem* 122 (1):180-185; Wang HT et al. (1994) *J Bacteriol.* 176(22):7091-5; Eriksson P et al. (1995) *Mol Microbiol.* 17(1):95-107; GenBank Acc.-No.: U04621, X76859, Z35169).
- 20 e) *Emericella nidulans* (GenBank Acc.-No.: AF228340)
- f) *Debaryomyces hansenii* (GenBank Acc.-No.: AF210060)
- 25 Es stellte sich daher die Aufgabe alternative Verfahren zur Erhöhung des Ölgehaltes in Pflanzen bereitzustellen. Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst.
- Ein erster Gegenstand der Erfindung umfasst ein Verfahren zum
- 30 Erhöhen des Gesamtölgehalt in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben, umfassend
- a) transgene Expression einer Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe in besagtem pflanzlichen Organismus oder einem
- 35 Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben und
- b) Auswahl von pflanzlichen Organismen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangsorganismus - der Gesamtölgehalt in dem besagten pflanzlichen Organismus oder einem
- 40 Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben erhöht ist.

Überraschenderweise konnte festgestellt werden, dass die samen-spezifische heterologe Expression des Hefeproteins Gpd1p (G3PDH aus *Saccharomyces cerevisiae*; SEQ ID NO: 2) in *Arabidopsis*-Samen

45 zu einer signifikanten Erhöhung des Gehalts an Triacylglyceriden (Speicheröle) führt. Der Ölgehalt wurde dabei um etwa 22 %, in einer transgenen Linie sogar um 41 %, verglichen mit Wildtyp-

## 5

Kontrollpflanzen gesteigert (siehe Fig. 1). Die transgene Expression der Glycerol 3-phosphat Dehydrogenase aus Hefe zeigte keine nachteiligen Effekte auf das Wachstum oder andere Eigenschaften der transformierten Pflanzen.

- 5 Da G3PDH ein Schlüsselenzym der Biosynthese in allen pflanzlichen Organismen ist, kann das erfindungsgemäße Verfahren im Prinzip auf alle Pflanzenarten - neben der als Modelnpflanze eingesetzten Art *Arabidopsis thaliana* - angewendet werden. Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren auf Ölpflanzen angewendet, die
- 10 bereits natürlicherweise einen hohen Ölgehalt aufweisen und/oder zu industriellen Gewinnung von Ölen verwendet werden.

- "Pflanzlicher Organismus oder Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut desselben" meint allgemein jeden ein oder mehr-
- 15 zelligen Organismus oder ein Zelle, Gewebe, Teile oder Vermehrungsgut (wie Samen oder Früchte) desselben, der zur Photosynthese befähigt ist. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und
- 20 dicotyledone Pflanzen sind bevorzugt. Eingeschlossen sind reife Pflanze, Saatgut, Sprosse und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut (zum Beispiel Knollen, Samen oder Früchte) und Kulturen, zum Beispiel Zell- oder Kalluskulturen.
- 25 "Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niederer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und
- 30 andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungs-
- 35 stadium.

- "Pflanze" umfasst alle einjährigen und mehrjährige, monocotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielhaft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis,
- 40 Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus,
- 45 Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panieum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis,

## 6

Browaalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.

Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien: Amaranth-  
5 aceae, Asteraceae, Brassicaceae, Carophyllaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Labiatae, Leguminosae, Papilionoideae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Saxifragaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Sterculiaceae, Tetragnoniaceae, Theaceae, Umbelliferae.

10

Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr

15 sowie alle Arten von Gräsern.

Die Erfindung wird ganz besonders bevorzugt aus dikotyledonen pflanzlichen Organismen angewendet. Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen,

20 wie zum Beispiel

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere mehr,

25 

- Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr,

30 

- Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv Emperor (Broccoli) und weitere Kohllarten; und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana sowie Kresse oder Canola und andere mehr,

35 

- Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,

- Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) Soja sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss und andere mehr

40

- Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffeestrauch) und andere mehr,

45 

- Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate), die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine)

## 7

und die Gattung *Capsicum*, ganz besonders die Art *annuum* (Pfeffer) sowie Tabak oder Paprika und andere mehr,

- Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise *Theobroma cacao* (Kakaostrauch) und andere mehr,
  - Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise *Camellia sinensis* oder *Thea sinensis* (Teestrauch) und andere mehr,
  - Umbelliferae, besonders die Gattung *Daucus* (ganz besonders die Art *carota* (Karrotte)) und *Apium* (ganz besonders die Art *graveolens dulce* (Selderie)) und andere mehr;
  - sowie Lein, Baumwolle, Hanf, Flachs, Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.
- Umfasst sind ferner Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträucher oder Rasen. Beispielfhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen Angiospermen, Bryophyten wie zum Beispiel Hepaticae (Leberblümchen) und Musci (Moose); Pteridophyten wie Farne, Schachtelhalm und Lycopoden; Gymnospermen wie Koniferen, Cycaden, Ginkgo und Gnetales, die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.

- Pflanzliche Organismen im Sinne der Erfindung sind weiterhin weitere photosynthetisch aktive befähigte Organismen, wie zum Beispiel Algen, Cyanobakterien sowie Moose. Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Insbesondere bevorzugt ist *Synechocystis*.

- Am meisten bevorzugt sind Ölpflanzen. Ölpflanzen meint Pflanzen, die bereits natürlicherweise einen hohen Ölgehalt aufweisen und/oder zu industriellen Gewinnung von Ölen verwendet werden. Diese Pflanzen können einen hohen Ölgehalt und/oder aber eine besondere, industriell interessante Fettsäurezusammensetzung aufweisen. Bevorzugt sind Pflanzen, die einen Lipidanteil von mindestens 1 Gew.-% aufweisen. Ölpflanzen umfassen beispielsweise:

## 8

- Borago officinalis (Borretsch); Brassica Arten wie *B. campestris*, *B. napus*, *B. rapa* (Senf, Raps oder Rübsel); *Cannabis sativa* (Hanf); *Curthamus tinctorius* (Färberdiestel); *Cocos nucifera* (Kokosnuss); *Crambe abyssinica* (Krambe); *Cuphea* Arten (*Cuphea* Arten liefern fettsäuren von mittlerer Kettenlänge insbesondere für industrielle Anwendungen); *Elaeis guinensis* (Afrikanische Ölpalme); *Ekeis oleiferu* (Amerikanische Ölpalme); *Glycine max* (Sojabohne); *Gossypium hirsutum* (Amerikanische Baumwolle); *Gossypium barbadense* (Ägyptische Baumwolle); *Gossypium herbaceum* (Asiatische Baumwolle); *Helianthus annuus* (Sonnenblume); *Linum usitatissimum* (Lein oder Flachs); *Oenethem biennis* (Nachtkerze); *Ozea europea* (Olive); *Oryza sativa* (Rice); *Ricinus communis* (Castor); *Sesamum indicum* (Sesam); *Triticum* Arten (Weizen); *Zea maize* (Mais) sowie verschiedene Nussarten wie beispielsweise Walnuss oder Mandel.

"Gesamtölgehalt" meint die Summe aller Öle, bevorzugt die Summe die Triacylglyceride.

- 20 "Öle" umfasst neutrale und/oder polare Lipiden und Mischungen derselben. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 aufgeführten zu nennen.

Tab. 1: Pflanzliche Lipidklassen

25

30

35

|                 |                                     |
|-----------------|-------------------------------------|
| Neutrale Lipide | Triacylglycerol (TAG)               |
|                 | Diacylglycerol (DAG)                |
|                 | Monoacylglycerol (MAG)              |
|                 |                                     |
| Polare Lipide   | Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) |
|                 | Digalactosyldiacylglycerol (DGDG)   |
|                 | Phosphatidylglycerol (PG)           |
|                 | Phosphatidylcholine (PC)            |
|                 | Phosphatidylethanolamine (PE)       |
|                 | Phosphatidylinositol (PI)           |
|                 | Phosphatidylserin (PS)              |
|                 | Sulfoquinovosyldiacylglycerol       |

- Neutrale Lipide meint bevorzugt Triacylglyceride. Sowohl die neutralen als auch die polaren Lipide können ein breites Spektrum an verschiedenen Fettsäuren enthalten. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 2 aufgeführten Fettsäuren zu nennen.

45

## 9

Tab. 2: Übersicht über verschiedene Fettsäuren (Auswahl)

<sup>1</sup> Kettenlänge:Anzahl der Doppelbindungen

\* nicht natürlicherweise in Pflanzen vorkommend

|    |                          |                             |
|----|--------------------------|-----------------------------|
| 5  | Nomenklatur <sup>1</sup> | Name                        |
|    | 16:0                     | Palmitinsäure               |
|    | 16:1                     | Palmitoleinsäure            |
|    | 16:3                     | Roughaninsäure              |
| 10 | 18:0                     | Stearinsäure                |
|    | 18:1                     | Ölsäure                     |
|    | 18:2                     | Linolsäure                  |
|    | 18:3                     | Linolensäure                |
|    | γ-18:3                   | Gamma-Linolensäure*         |
| 15 | 20:0                     | Arachidinsäure              |
|    | 22:6                     | Docosahexanonsäure (DHA) *  |
|    | 20:2                     | Eicosadienonsäure           |
|    | 20:4                     | Arachidonsäure (AA) *       |
|    | 20:5                     | Eicosapentaenosäure (EPA) * |
|    | 22:1                     | Erucasäure                  |

20 Öle meint bevorzugt Samenöle.

"Erhöhung" des Gesamtölgehaltes meint die Steigerung des Gehaltes an Ölen in einer Pflanze oder einem Teil, Gewebe oder Organ derselben, bevorzugt in den Samenorganen der Pflanze. Dabei ist

25 der Ölgehalt im Vergleich zu einer nicht dem erfindungsgemäßen Verfahren unterworfenen, aber ansonsten unveränderten Ausgangspflanze unter ansonsten gleichen Rahmenbedingungen um mindestens 5 %, bevorzugt mindestens 10 %, besonders bevorzugt mindestens 15 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 20 %, am meisten

30 bevorzugt mindestens 25 % erhöht. Rahmenbedingungen meint dabei alle für die Keimung, Kultivierung oder Wachstum der Pflanze relevanten Bedingungen wie Boden-, Klima- oder Lichtverhältnisse, Düngung, Bewässerung, Pflanzenschutzmaßnahmen usw.

35 "Glycerol 3-phosphat Dehydrogenase aus Hefe" (infolge "Hefe G3PDH") meint allgemein all solche Enzyme, die in der Lage sind, Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Glycerol-3-phosphat (G3P) - bevorzugt unter Verwendung eines Cosubstrates wie NADH - umzusetzen und natürlicherweise in einer Hefe exprimiert werden.

40

Hefen meint eine die Gruppe einzelliger Pilze mit ausgeprägter Zellwand und Bildung von Pseudomyzel (im Ggs. zu Schimmelpilzen). Ihre Vermehrung erfolgt vegetativ durch Sprossung und/oder Spaltung (Schizosaccharomyces bzw. Saccharomyces).

45

## 10

- Umfasst sind sogenannte unechte Hefen, und zwar bevorzugt die Familien Cryptococcaceae, Sporobolomycetaceae mit den Gattungen Cryptococcus, Torulopsis, Pityrosporum, Brettanomyces, Candida, Kloeckera, Trigonopsis, Trichosporon, Rhodotorula bzw. Sporobolomyces und Bullera, sowie echte Hefen (Hefen mit auch geschlechtlicher Vermehrung; Ascus), und zwar bevorzugt die Familien Endo- u. Saccharomycetaceae, mit den Gattungen Saccharo-, Debaromyces, Lipomyces, Hansenula, Endomycopsis, Pichia, Hanseniaspora. Am meisten bevorzugt sind die Arten Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, Hansenula polymorpha, Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Zygosaccharomyces rouxii, Yarrowia lipolytica, Emericella nidulans, Aspergillus nidulans, Debaryomyces hansenii und Torulaspora hansenii..
- 15 Hefe G3PDH meint insbesondere Polypeptide die als "wesentlichen Eigenschaften" nachfolgende Eigenschaften aufweisen:
- a) die Umsetzung von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-3-phosphat unter Verwendung von NADH als Cosubstrat (EC 1.1.1.8), und
  - b) eine Peptidsequenz umfassend mindestens ein Sequenzmotiv ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzmotiven bestehend aus
    - i) GSGNWGT(A/T)IAK (SEQ ID NO: 22)
    - ii) CG(V/A)LSGAN(L/I/V)AXE(V/I)A (SEQ ID NO: 26)
    - iii) (L/V)FXRPYFXV (SEQ ID NO: 27)
- bevorzugt ist das Sequenzmotiv ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- iv) GSGNWGTTIAKV(V/I)AEN (SEQ ID NO: 29)
  - v) NT(K/R)HQNVKYL (SEQ ID NO: 30)
  - vi) D(I/V)LVFN(I/V)PHQFL (SEQ ID NO: 31)
  - vii) RA(I/V)SCLKGFE (SEQ ID NO: 32)
  - viii) CGALSGANLA(P/T)EVA (SEQ ID NO: 33)
  - ix) LFHRPYFHV (SEQ ID NO: 34)
  - x) GLGEII(K/R)FG (SEQ ID NO: 35)
- besonders bevorzugt enthält die Peptidsequenz mindestens 2 oder 3, ganz besonders bevorzugt mindestens 4 oder 5, am meisten bevorzugt alle der Sequenzmotive ausgewählt aus der Gruppe der Sequenzmotive i), ii) und iii) oder ausgewählt aus der Gruppe der Sequenzmotive iv), v), vi), vii), viii), ix) und xiv). (Angaben in Klammern meinen alternativ mögliche Aminosäuren an dieser Position; z.B. mein (V/I), dass an dieser Position Valin oder Isoleucin möglich ist).

## 11

Weiterhin kann eine Hefe G3PDH optional - zusätzlich zu mindestens einem der oben genannten Sequenzmotive i) bis x) - weitere Sequenzmotive umfassen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- 5 xi) H(E/Q)NVKYL (SEQ ID NO: 23)  
 xii) (D/N) (I/V) (L/I) V(F/W) (V/N) (L/I/V) PHQF(V/L/I) (SEQ ID NO: 24)  
 xiii) (A/G) (I/V) SC(L/I) KG (SEQ ID NO: 25)  
 10 xiv) G(L/M) (L/G) E(M/I) (I/Q) (R/K/N) F(G/S/A) (SEQ ID NO: 28)

Am meisten bevorzugt meint Hefe G3PDH das Hefeproteins Gpd1p gemäß SEQ ID NO: 2, sowie funktionelle Äquivalente als auch funktionell äquivalente Teile der vorgenannten.

- 15 Funktionelle Äquivalente meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen des Hefeproteins Gpd1p gemäß SEQ ID NO: 2 sowie homologe Polypeptide aus anderen Hefen, die die gleichen wesentlichen Eigenschaften einer Hefe G3PDH, entsprechend  
 20 oben gegebener Definition, aufweisen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste. Insbesondere Bevorzugt sind die Polypeptide beschrieben durch SEQ ID NO: 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 38 oder 40.

- 25 Die zu den im Rahmen dieser Erfindung vorteilhaft einzusetzenden Hefe G3PDH können durch Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen- oder cDNA-Bibliotheken - unter Verwendung der beispielhaft aufgeführten Hefe G3PDH-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 oder der für  
 30 dieses kodierenden Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 als Suchsequenz bzw. Sonde - leicht aufgefunden werden.

- Bevorzugt haben besagte funktionelle Äquivalente eine Homologie von mindestens 60 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %,   
 35 besonders bevorzugt mindestens 80 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % zu dem Protein mit der SEQ ID NO: 2.

- Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die gesamte Sequenzlänge verstanden,   
 40 die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

- |    |                      |                          |
|----|----------------------|--------------------------|
| 45 | Gap Weight: 8        | Length Weight: 2         |
|    | Average Match: 2,912 | Average Mismatch: -2,003 |

## 12

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist. Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die eine Homologie von mindestens 60 %, besonders bevorzugt mindestens 70 %, besonders bevorzugt mindestens 80 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % zu der Nukleinsäuresequenz mit der SEQ ID NO: 1 haben.

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der beiden Nukleinsäuresequenzen über die gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

|    |                   |                     |
|----|-------------------|---------------------|
| 20 | Gap Weight: 50    | Length Weight: 3    |
|    | Average Match: 10 | Average Mismatch: 0 |

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

30 Funktionelle Äquivalente umfasst auch solche Proteine, die durch Nukleinsäuresequenzen kodiert werden, die unter Standardbedingungen mit einer der durch SEQ ID NO: 1 beschriebenen Nukleinsäuresequenz, der zu dieser komplementären Nukleinsäuresequenz oder Teilen der vorgenannten hybridisieren und die wesentlichen Eigenschaften einer Hefe G3PDH aufweisen.

"Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen, meint aber bevorzugt stringent Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben. Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschruttes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0,2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC:

## 13

0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,0). Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50 % Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Expressionskonstrukte, die eine transgene Expression einer Hefe G3PDH, in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil Zellen oder Vermehrungsmaterial des

10 besagten pflanzlichen Organismus gewährleisten können.

Für die Hefe G3PDH gilt dabei die oben genannte Definition, besonders bevorzugt ist die transgene Expression einer Hefe G3PDH beschrieben durch die Sequenz mit der SEQ ID NO: 2.

15

In besagten transgenen Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül kodierend für eine Hefe G3PDH bevorzugt in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem genetischen Kontrollelement (beispielsweise einem Promotor), das eine

20 Expression in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsmaterial desselben gewährleistet.

Insbesondere bevorzugt sind transgene Expressionskassetten, wobei

25 die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase beschrieben ist durch

a) eine Sequenz mit der SEQ ID NO: 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 37 oder 39 oder

30

b) eine Sequenz, die sich entsprechend dem degenerierten genetischen Code von einer Sequenz mit der SEQ ID NO: 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 37 oder 39 ableitet, oder

35 c) eine Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % zu der Sequenz mit der SEQ ID NO: 1 aufweist.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu

40 exprimierenden Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Hefe G3PDH (zum Beispiel der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu  
45 ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter ent-

## 14

- fernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide
- 5 Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.
- 10 Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer transgenen Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und
- 15 Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology,
- 20 Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymchnittstellen oder eines
- 25 Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann die Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein
- 30 pflanzliches Genom insertiert werden.

- Unter einer transgenen Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Hefe G3PDH so hinter einen endogenen,
- 35 pflanzlichen Promotor platziert wird, dass dieser die Expression der Hefe G3PDH bewirkt.

- Bevorzugt werden in den transgenen Expressionskassetten Promotoren eingesetzt, die in einem pflanzlichen Organismus
- 40 oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsmaterial desselben funktionell sind. In pflanzlichen Organismen funktionelle Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann.
- 45 Dabei kann die Expression beispielsweise konstitutiv, induzierbar oder entwicklungsabhängig sein.

## 15

Bevorzugt sind:

## a) Konstitutive Promotoren

- 5 "Konstitutive" Promotoren meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Vorzugsweise
- 10 verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver
- 15 Promotor ist der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den SmaS Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Unter-
- 20 einheiten, den Promotor des Nitrilase-1 Gens aus Arabidopsis thaliana (GenBank Acc.-No.: U38846, Nukleotide 3862 bis 5325 oder alternativ 5342) oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist. Besonders bevorzugt sind der CaMV
- 25 35S-Promotor und der Nitrilase-1 Promotor aus Arabidopsis thaliana.

## b) Gewebespezifische Promotoren

- 40 Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für Samen, wie zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), des 2S Albumingens (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989) Mol Gen Genet 215(2):326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), des Napin Gens (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta
- 45

## 16

- 199:515-519), des Saccharosebindepoteins (WO 00/26388) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Baumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225: 121-128; Baumlein et al. (1992) Plant Journal 2(2):233-9; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), der Oleosin-Promoter aus Arabidopsis (WO 98/45461), der Bce4-Promoter aus Brassica (WO 91/13980).

- Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens).

- 20 c) Chemisch induzierbare Promotoren

- Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden. Ferner geeignet ist der Promotor des Glutathione-S-transferase Isoform II Gens (GST-II-27), der durch exogen applizierte Safener wie z.B. N,N-Diallyl-2,2-dichloroacetamid aktiviert werden kann (WO 93/01294) und in zahlreichen Geweben von sowohl Monokotyledonen als auch Dikotyledonen funktionell ist.

- Besonders bevorzugt sind konstitutive sowie ganz besonders bevorzugt samenspezifische Promotoren, insbesondere der Napin- und der USP-Promotor.

## 17

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen. Als  
5 Pflanzen Promotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

- Die in den erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten oder transgenen Vektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können  
10 mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette haben. Genetische Kontroll-  
15 sequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen pflanzenspezifischen  
20 Promoter und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.
- 25 Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren  
30 erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135) und Hitzestress (Schoffl F et al. (1989) Mol Gen Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.
- 35 Weitere vorteilhafte Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFa, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH.

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

- Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von  
45 Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116,

## 18

- Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente
- 5 Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebespezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).
- 10 Die transgene Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende
- 15 der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.
- 20 Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase)
- 25 des Ti-Plasmids pTiACHS entsprechen (Gielen et al. (1984) EMBO J 3:835 ff) oder funktionelle Äquivalente davon. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalinsynthase)-Terminator.
- 30 Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel die kodierende Sequenz eines bestimmten endogenen Gens gegen
- 35 die für eine dsRNA kodierende Sequenz gezielt ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende
- 40 Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.
- Eine transgene Expressionskassetten und die von ihr abgeleiteten transgenen Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten.
- 45 Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassetten,

## 19

Vektoren oder transgenen Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

- a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen  
5 Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbizide, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, oder Phosphinotricin etc. verleihen. Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen  
10 Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat®  
15 (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), Sulfonylhurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die  
20 für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferase (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthase Gen (ALS), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).  
30
- b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders  
35 bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784), die Chloramphenicoltransferase, eine Luciferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859), das Aequorin-Gen (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun  
40 126(3):1259-1268), die  $\beta$ -Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist die  $\beta$ -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907).
- 45 c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin

## 20

of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

5

- d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzen-transformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

- 10 Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxy-
- 15 glucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).
- 20 Zusätzlich kann besagte transgene Expressionskassette oder Vektoren weitere Nukleinsäuresequenzen enthalten, die nicht für eine Hefe G3PDH kodieren, und deren transgene Expression zu einer zusätzlichen Steigerung der Fettsäure-Biosynthese führt (infolge proOIL). Diese zusätzlich transgen exprimierte proOIL Nuklein-
- 25 säuresequenz kann beispielhaft aber nicht einschränkend ausgewählt sein aus Nukleinsäuren kodierend für Acetyl-CoA-Carboxylase (ACCase), Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase (GPAT), Lysophosphatidat-Acyltransferase (LPAT), Diacylglycerol-Acyltransferase (DAGAT) und Phospholipid:diacylglycerol-acyltransferase (PDAT).
- 30 Entsprechende Sequenzen sind dem Fachmann bekannt und aus Datenbanken oder entsprechenden cDNA-Banken der jeweiligen Pflanzen leicht zugänglich.

- Die Einführung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette in
- 35 einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen), kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die transgenen Expressionskassetten enthalten sind. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung
- 40 betrifft daher besagte transgene Vektoren, die eine transgene Expressionskassette für eine Hefe G3PDH umfassen.

- Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein. Die Expressionskassette kann in
- 45 den Vektor (bevorzugt ein Plasmidvektor) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Der entstandene Vektor wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt trans-

## 21

formierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und der rekombinante Vektor mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu prüfen. Bevorzugt sind solche

5 Vektoren, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene pflanzliche Organismen oder Gewebe, Organ, Teil, Zellen oder
- 10 Vermehrungsgut desselben, die eine Hefe G3PDH entsprechend oben gegebener Definition, eine transgene Expressionskassette für eine Hefe G3PDH oder einen transgenen Vektor umfassend eine solche Expressionskassette enthalten.
- 15 Die Herstellung eines entsprechenden transgenen pflanzlichen Organismus erfolgt z.B. mittels Transformation oder Transfektion mittels der entsprechenden Proteine oder Nukleinsäuren. Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende
- 20 DNA (z.B. der Expressionsvektor), RNA oder Protein in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann
- 25 die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch
- 30 Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Möglich sind ferner das Quellen von
- 35 Pflanzenteilen in DNA-Lösungen sowie Pollen- oder Pollenschlauchtransformation. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhaus et al. (1987) Theor Appl
- 40 Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231; DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91:694-701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular
- 45 Biology (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).

## 22

- Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.
- 10 Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* und Übertragung von entsprechenden rekombinanten Ti-Plasmiden oder Ri-Plasmiden
- 15 durch oder durch Infektion mit transgenen Pflanzenviren durchgeführt werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985) Science 225: 1229f).
- 20 Werden *Agrobacterien* verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation
- 25 verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden Expressionskassette verbunden.
- 30 Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in *Agrobacterium* replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in *Agrobacterium*
- 35 transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter *Agrobakteria* und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende *Agrobacterium* sollte bereits ein
- 40 Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes *Agrobacterium* kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und
- 45 beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren

## 23

sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA).

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind  
5 beschrieben (Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden  
10 Organismus und Zelltyp. Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen  
15 regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von  
20 untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, das eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.).  
25 Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, das Resistenz gegen das Herbizid  
30 Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, das Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von trans-  
35 formierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

40

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S.128-143 sowie in Potrykus  
45 (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225). Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu trans-

## 24

formieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann  
5 eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt  
10 und gezüchtet werden.

Dem Fachmann sind auch Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992)  
15 Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet.

"Transgen" meint bezüglich zum Beispiel einer Hefe G3PDH Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend besagte G3PDH Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit besagter Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommene Konstruktionen, in denen sich entweder

- 25
- a) die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Hefe G3PDH, oder
  - b) eine mit besagter Nukleinsäuresequenz unter a) funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein in  
30 pflanzlichen Organismen funktioneller Promotor, oder
  - c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden  
35 oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus  
40 oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens  
45 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise

## 25

die natürlich vorkommende Kombination des Promotors eines Gens kodierend für eine Hefe G3PDH mit dem entsprechenden Hefe G3PDH-Gen wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie  
5 beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangs-  
10 organismen sind vor allem Pflanzen gemäß der oben genannten Definition. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches, insbesondere Pflanzen, die für die Gewinnung von Ölen verwendet werden wie beispielsweise Raps, Sonnenblume,  
15 Sesam, Färberdistel, Ölbaum, Soja, Mais, Weizen und Nussarten. Eingeschlossen sind ferner die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut und Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des  
20 Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

Die Herstellung der transgenen Organismen kann mit den oben beschriebenen Verfahren zur Transformation oder Transfektion  
25 von Organismen realisiert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei  
30 transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-, und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien, insbesondere von Ölen, Fetten, Fettsäuren oder Derivaten der vorgenannten.

35 Neben der Beeinflussung des Ölgehaltes kann die transgene Expression einer Hefe G3PDH in Pflanzen noch weitere vorteilhafte Effekte vermitteln, wie beispielsweise eine erhöhte Stressresistenz z.B. gegen osmotischen Stress. Die Hefe G3PDH vermittelt über erhöhte Glycerolspiegel einen Schutz gegen der-  
40 artigen Stress, indem Glycerol als Osmoprotektivum wirkt. Derartige osmotischer Stress tritt beispielsweise bei salzhaltigen Böden und Wasser auf und ist ein zunehmendes Problem in der Landwirtschaft. Eine erhöhte Stresstoleranz bietet hier beispiels-  
45 weise die Möglichkeit zur landwirtschaftlichen Nutzung von Flächen, in denen übliche Ackerpflanzen nicht gedeihen können.

**26**

Ferner kann die transgene Expression der Hefe G3PDH den NADH Spiegel und so das REDOX-Gleichgewicht in dem pflanzlichen Organismus beeinflussen. Stress, wie beispielsweise Trockenheit, Hitze, Kälte, UV Licht etc. kann zu erhöhten NADH Spiegeln und zu einer vermehrten Bildung von reaktivem Sauerstoff (ROS) führen. Die transgene Expression der Hefe G3PDH kann einen unter besagten Stressbedingungen anfallenden NADH Überschuss abbauen, so das REDOX-Gleichgewicht stabilisieren und die Auswirkungen des Stress mildern.

**10****15****20****25****30****35****40****45**

## 27

## Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae*  
5 G3PDH (Gpd1p)
2. SEQ ID NO: 2  
Proteinsequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae* G3PDH  
(Gpd1p)  
10
3. SEQ ID NO: 3  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae*  
G3PDH (Gpd2p)
- 15 4. SEQ ID NO: 4  
Proteinsequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae* G3PDH  
(Gpd2p)
5. SEQ ID NO: 5  
20 Proteinsequenz kodierend für *Saccharomyces cerevisiae* G3PDH  
(Gpd2p) mit zweitem, alternativem Start-Codon
6. SEQ ID NO: 6  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Schizosaccharomyces pombe*  
25 G3PDH
7. SEQ ID NO: 7  
Proteinsequenz kodierend für *Schizosaccharomyces pombe* G3PDH  
30
8. SEQ ID NO: 8  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Schizosaccharomyces pombe*  
G3PDH
- 35 9. SEQ ID NO: 9  
Proteinsequenz kodierend für *Schizosaccharomyces pombe* G3PDH
10. SEQ ID NO: 10  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Yarrowinia lipolytica* G3PDH  
40
11. SEQ ID NO: 11  
Proteinsequenz kodierend für *Yarrowinia lipolytica* G3PDH
12. SEQ ID NO: 12  
45 Proteinsequenz kodierend für *Yarrowinia lipolytica* G3PDH, mit  
zweitem, alternativem Start-Codon

## 28

13. SEQ ID NO: 13  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Zygosaccharomyces rouxii* G3PDH
- 5 14. SEQ ID NO: 14  
Proteinsequenz kodierend für *Zygosaccharomyces rouxii* G3PDH
15. SEQ ID NO: 15  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Zygosaccharomyces rouxii* G3PDH
- 10 16. SEQ ID NO: 16  
Proteinsequenz kodierend für *Zygosaccharomyces rouxii* G3PDH
- 15 17. SEQ ID NO: 16  
Expressionsvektor auf Basis von pSUN-USP für *S.cerevisiae* G3PDH (Gpd1p; Insert von bp 1017 - 2190)
18. SEQ ID NO: 18 Oligonukleotidprimer ONP1
- 20 5'-ACTAGTATGTCTGCTGCTGCTGATAG-3'
19. SEQ ID NO: 19 Oligonukleotidprime ONP2
- 5'-CTCGAGATCTTCATGTAGATCTAATT-3'
- 25 20. SEQ ID NO: 20 Oligonukleotidprime ONP3
- 5'-GCGGCCCGCCATGTCTGCTGCTGCTGATAG-3'
21. SEQ ID NO: 21 Oligonukleotidprime ONP4
- 5'-GCGGCCCGCATCTTCATGTAGATCTAATT-3'
- 30 22-35: SEQ ID NP 22 bis 35: Sequenzmotive für Hefe G3PDHs mit Angabe von möglichen Sequenzvariationen. Die Variationen eines einzelnen Motives können jeweils einzeln aber auch in den unterschiedlichen Kombinationen miteinander vor-
- 35 kommen.
36. SEQ ID NO: 36  
Expressionsvektor pGPTV-gpd1 auf Basis von pGPTV-Napin für *S.cerevisiae* G3PDH (Gpd1p; Insert gdp1 von bp 11962-13137; nos-Terminator: 13154-13408; Napin-Promotor: 10807-11951).
- 40 37. SEQ ID NO: 37  
Nukleinsäuresequenz kodierend für *Emericella nidulans* G3PDH
- 45 38. SEQ ID NO: 38  
Aminosäuresequenz kodierend für *Emericella nidulans* G3PDH

## 29

39. SEQ ID NO: 39

Nukleinsäuresequenz kodierend für *Debaryomyces hansenii* G3PDH  
(partiell)

5 40. SEQ ID NO: 40

Aminosäuresequenz kodierend für *Debaryomyces hansenii* G3PDH  
(partiell)

## Abbildungen

10

Fig. 1: Ölgehalt in transgenen GPD1p-Linien

15

20

Messung des TAG-Gehalts in T2 Samen von transgenen Arabidopsis-Linien mit dem Gpd1p-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* (G2 bis G30). Zum Vergleich ist der Gehalt in entsprechenden untransformierten (Wilttyp-Pflanzen; W1 bis W10) bestimmt worden. Es wurden 8 Arabidopsis-Linien mit einem signifikant gesteigertem Ölgehalt identifiziert. Die angegebenen Fehlerabweichung ergeben sich aus jeweils 3 unabhängigen Messungen.

Fig. 2: Bestimmung des Ölgehalts in Samen der T3 Generation.

25

30

Wiedergegeben ist der Ölgehalt (in mg Lipid pro g Trockengewicht (DW)) einzelner Arabidopsis-Linien. Jede Säule stellt den Mittelwert aus 6 individuellen Pflanzen pro unabhängiger Linie dar. Von jeder Pflanze wurde eine dreifach Bestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalker bezeichnen die Standardabweichung über alle Werte. Die Kontrollpflanzen sind mit 'col' bezeichnet. Die Einzelwerte sind numerisch zusätzlich in folgender Wertetabelle wiedergegeben (die Kontrolle wurde auf 100% Ölgehalt gesetzt):

35

40

45

| Linien | Ölgehalt<br>(mg/g) | STD  | Rel. Anstieg<br>in % |
|--------|--------------------|------|----------------------|
| col    | 278,1              | 12,2 | 100                  |
| #11    | 304,6              | 18,3 | 110                  |
| #12    | 301,4              | 19,0 | 108                  |
| #13    | 275,2              | 89,7 | 99                   |
| #21    | 323,2              | 77,0 | 116                  |
| #24    | 268,9              | 15,1 | 97                   |
| #25    | 293,6              | 23,0 | 106                  |
| #27    | 285,6              | 18,4 | 103                  |
| #41    | 316,1              | 19,1 | 114                  |
| #53    | 260,3              | 16,4 | 94                   |
| #67    | 292,0              | 13,8 | 105                  |
| #71    | 244,1              | 11,6 | 88                   |
| #82    | 295,6              | 16,8 | 106                  |

## 30

Linien mit einem statistisch signifikant erhöhtem Lipidgehalt (Linien #11, #21, #41 und #67) sind mit schwarzen Balken präsentiert.

5 Fig. 3: Bestimmung der Aktivität von G3PDH in der Kontrolle (,col') und den gdp1 transformierten Pflanzen.

10 Die G3PDG Aktivität der einzelnen Linien wurde wie in Beispiel 8 beschrieben bestimmt und ist in nmol G3P pro Minute und g Feuchtgewicht (FW) wiedergegeben.

|        | G3PDH Aktivität | STD        |
|--------|-----------------|------------|
| col    | 6,68337432      | 0,71785229 |
| #11    | 11,8958635      | 1,67941604 |
| #12    | 9,14226124      | 2,25411878 |
| 15 #13 | 8,8210768       | 2,19519777 |
| #21    | 9,88435444      | 1,04798566 |
| #24    | 5,89378595      | 1,26005769 |
| #25    | 5,14179348      | 1,22845409 |
| #27    | 6,77303725      | 3,22220935 |
| #41    | 20,8325636      | 5,42018531 |
| 20 #53 | 7,45794947      | 2,25573816 |
| #67    | 12,7670015      | 0,74678353 |
| #71    | 9,04748534      | 1,59829185 |
| #82    | 9,37260033      | 2,1356558  |

25 Linien mit einer statistisch signifikant erhöhten G3PDH-Aktivität (Linien #11, #21, #41 und #67) sind mit schwarzen Balken präsentiert. Es ist erkennbar, dass eine erhöhte G3PDG Aktivität mit einem erhöhten Lipidgehalt korreliert.

30

Beispiele

Allgemeine Methoden:

35 Alle Chemikalien, wenn nicht anders erwähnt, stammen von den Firmen Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen). Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme und Molekularbiologie-Kits wurden von den Firmen Amersham-Pharmacia (Freiburg), Biometra (Göttingen), Roche  
 40 (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach), Novagen (Madison, Wisconsin, USA), Perkin-Elmer (Weiterstadt), Qiagen (Hilden), Stratagen (Amsterdam, Niederlande), Invitrogen (Karlsruhe) und Ambion (Cambridgeshire, United Kingdom). Die verwendeten  
 45 Reagenzien wurden entsprechend der Angaben des Herstellers eingesetzt.

## 31

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

## Beispiel 1: Allgemeine Verfahren

Die Pflanze *Arabidopsis thaliana* repräsentiert ein Mitglied der höheren Pflanzen (Samenpflanzen). Diese Pflanze ist eng verwandt mit anderen Pflanzenarten aus der Familie der Cruciferen wie z.B. *Brassica napus*, aber auch mit anderen Pflanzenfamilien der Dikotyledonen. Aufgrund des hohen Grades an Homologie ihrer DNA-Sequenzen bzw. Polypeptidsequenzen kann *Arabidopsis thaliana* als Modellpflanze für andere Pflanzenarten eingesetzt werden.

a) Anzucht von *Arabidopsis* Pflanzen

Die Pflanzen werden entweder auf Murashige-Skoog Medium mit 0,5 % Saccharose (Ogas et al. (1997) Science 277:91-94) oder auf Erde gezogen (Focks & Benning (1998) Plant Physiol 118:91-101). Um einheitliche Keimungs- und Blühzeiten zu erreichen, werden die Samen nach Ausplattieren bzw. Ausstreuen auf Erde zwei Tage bei 4°C stratifiziert. Nach der Blüte werden die Schoten markiert. Entsprechend der Markierungen werden dann Schoten mit einem Alter von 6 bis 20 Tagen nach der Blüte geerntet.

## Beispiel 2: Klonierung des Gpd1-Gens aus Hefe

Genomische DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* Stamm S288C (Mat alpha SUC2 mal mel gal2 CUP1 flo1 flo8-1; Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde nach folgendem Protokoll isoliert:

Eine 100 ml Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte von 1,0 bei 30°C angezogen. Davon wurden 60 ml abzentrifugiert bei 3000 xg für 3 min. Das Pellet wurde in 6 ml doppelt-destilliertem H<sub>2</sub>O

## 32

resuspendiert und auf 1,5 ml Gefäße verteilt, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden mit 200 µl Lösung A, 200 µL Phenol/Chloroform (1:1) und 0,3 g Glaskugeln durch Vortexen resuspendiert und lysiert. Nach Zugabe von 200 µl TE-Puffer pH 8,0 wurde für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde einer Ethanol-fällung mit 1 ml Ethanol unterzogen. Das erhaltene Pellet nach Fällung wurde in 400 µL TE-Puffer pH 8,0 + 30 µg/mL RnaseA gelöst. Nach Inkubation für 5 min bei 37°C wurden 18 µL 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,8 und 1 mL Ethanol zugegeben und die präzipitierte DNA durch Zentrifugation pelletiert. Das DNA-Pellet wurde in 25 µL doppelt-destilliertem H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration der genomischen DNA wurde durch deren Absorption bei 260 nm bestimmt.

## 15 Lösung A:

2 % Trition-X100  
1 % SDS  
0,1 M NaCl  
0,01 M Tris-HCl pH 8,0

## 20 0,001 M EDTA

Für die Klonierung des Gpd1-Gens wurde die isolierte Hefe-DNA in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotidprimern ONP1 und ONP2 eingesetzt.

## 25

ONP1: 5'-ACTAGTATGTCTGCTGCTGCTGATAG-3' (SEQ ID NO: 18)  
ONP2: 5'-CTCGAGATCTTCATGTAGATCTAATT-3' (SEQ ID NO: 19)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

## 30

5,00 µL 5 µg genomische Hefe-DNA  
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25 mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00 µL 2 mM dNTP  
1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)

## 35 0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

PCR-Programm:

## 40 Anfangsdenaturierung für 2 min bei 95°C, dann 35 Zyklen mit 45 sec 95°C, 45 sec 55°C und 2 min 72°C. Abschließende Extension von 5 min bei 72°C.

Das PCR-Produkte wurde in den pCR2.1-TOPO Vektor (Invitrogen)

## 45 gemäß Herstellerangaben kloniert, resultierend in dem Vektor pCR2.1-gpd1 und die Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft.

## 33

- Für die Klonierung in den Agrottransformationsvektor pGPTV wurden 0,5 µg des Vektors pCR2.1-gpd1 mit den Restriktionsenzym XhoI (New England Biolabs) für 2 Stunde inkubiert und anschließend 15 min mit Klenow-Fragment (New England Biolabs) inkubiert. Nach
- 5 Inkubation für 2 Stunden mit SpeI wurden die DNA-Fragmente per Gelelektrophorese aufgetrennt. Das neben dem Vektor (3,9 kb) 1185 bp große Fragment der gpd1-Sequenz wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem "Gelpurification"-Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 50 µL Elutionspuffer
- 10 eluiert. 0,1 µg des Vektors pGPTV wurde zuerst für 1 Stunde mit dem Restriktionsenzym SacI verdaut, dann für 15 min mit Klenow-Fragment (New England Biolabs) inkubiert. 10 µL des Eluates des gpd1-Fragments und 10 ng des behandelten Vektors pGPTV wurden über Nacht bei 16°C ligiert (T4 Ligase von New England Biolabs).
- 15 Die Ligationsprodukte werden dann in TOP10 Zellen (Stratagene) nach Herstellerangaben transformiert und entsprechend selektioniert, resultierend in dem Vektor pGPTV-gpd1. Positive Klone werden mit den Primern ONP1 und ONP2 durch PCR und Sequenzierung verifiziert.

## 20

Für die Herstellung des Vektors pSUN-USP-gpd1 wurde eine PCR vom Vektor pCR2.1-gpd1 mit den Primern ONP3 und ONP4 durchgeführt.

ONP3: 5'-GCGGCCGCCATGTCTGCTGCTGCTGATAG-3' (SEQ ID NO: 20)

25 ONP4: 5'-GCGGCCGCATCTTCATGTAGATCTAATT-3' (SEQ ID NO: 21)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 5 ng DNA Plasmid pCR2.1-gpd1  
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 30 5,00 µL 2 mM dNTP  
1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)  
0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

## 35

PCR-Programm:  
Anfangsdenaturierung für 2 min bei 95°C, dann 35 Zyklen mit 45 sec 95°C, 45 sec 55°C und 2 min 72°C. Abschließende Extension von 5 min bei 72°C.

## 40

- Das 1190 bp große PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym NotI für 24 Stunden verdaut. Der Vektor pSUN-USP wurde für 2 Stunden mit NotI verdaut, dann 15 min mit alkalischer Phosphatase (New England Biolabs) inkubiert. 100 ng des vor-
- 45 behandelten gpd1-Fragments und 10 ng des behandelten Vektors pGPTV wurden über Nacht bei 16°C ligiert (T4 Ligase von New England Biolabs). Die Ligationsprodukte werden dann in TOP10

## 34

Zellen (Stratagene) nach Herstellerangaben transformiert und entsprechend selektioniert, resultierend in dem Vektor pSUN-USP-gpd1. Positive Klone werden mit den Primern ONP3 und ONP4 durch PCR und Sequenzierung verifiziert.

5

Beispiel 3: Plasmide für die Pflanzentransformation

Zur Pflanzentransformation können binäre Vektoren, wie pBinAR verwendet werden (Höfgen und Willmitzer (1990) Plant Science  
10 66: 221-230). Die Konstruktion der binären Vektoren kann durch Ligation der cDNA in Sense- oder Antisense-Orientierung in T-DNA erfolgen. 5' der cDNA aktiviert ein Pflanzenpromotor die Transkription der cDNA. Eine Polyadenylierungssequenz befindet sich 3' von der cDNA.

15

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

Ein weiteres Beispiel für binäre Vektoren ist der Vektor pSUN-USP  
25 und pGPTV-Napin in welche das Fragment aus Beispiel 2 kloniert wurde. Der Vektor pSUN-USP enthält den USP-Promotor sowie den OCS Terminator. Der Vektor pGPTV-Napin enthält einen verkürzte Version des Napin-Promotors und den nos-Terminator.

30 Die Fragmente aus Beispiel 2 wurden in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pSUN-USP bzw. pGPTV-Napin kloniert, um die samenspezifische Expression des gdp1 Genes zu ermöglichen. Das entsprechende Konstrukt pSUN-USP-gpd1 ist mit der SEQ ID NO: 17 beschrieben, das Konstrukt von G3PDH in pGPTV-Napin (pGPTV-gpd1)  
35 ist durch SEQ ID NO: 36 beschrieben.

Beispiel 4: Transformation von Agrobacterium

Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann zum  
40 Beispiel unter Verwendung der Agrobacterium tumefaciens-Stämme GV3101 (pMP90) (Koncz und Schell (1986) Mol Gen Genet 204: 383-396) oder LBA4404 (Clontech) durchgeführt werden. Die Transformation kann durch Standard-Transformationstechniken durchgeführt werden (Deblaere et al. (1984) Nucl Acids Res 13:4777-4788).

45

## 35

## Beispiel 5: Pflanzentransformation

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

Die Transformation mittels Agrobacterium von Arabidopsis thaliana wurde durch die Methode nach Bechthold et al., 1993 (C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie., 316, 1194-1199) durchgeführt.

15

Beispielsweise kann Raps mittels Kotyledonen- oder Hypokotyl-transformation transformiert werden (Moloney et al. (1989) Plant Cell Report 8:238-242; De Block et al. (1989) Plant Physiol 91: 694-701). Die Verwendung von Antibiotika für die Agrobacterium-  
20   und Pflanzenselektion hängt von dem für die Transformation verwendeten binären Vektor und Agrobacterium-Stamm ab. Die Raps-selektion wird gewöhnlich unter Verwendung von Kanamycin als selektierbarem Pflanzenmarker durchgeführt.

25   Der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer in Lein (Linum usitatissimum) lässt sich unter Verwendung von beispielsweise einer von Mlynarova et al. (1994) Plant Cell Report 13:282-285 beschriebenen Technik durchführen. Die Transformation von Soja kann unter Verwendung von beispielsweise einer in EP-A-0 0424 047  
30   (Pioneer Hi-Bred International) oder in EP-A-0 0397 687, US 5,376,543, US 5,169,770 (University Toledo) beschriebenen Technik durchgeführt werden.

Die Pflanzentransformation unter Verwendung von Teilchen-  
35   beschuss, Polyethylenglycol-vermittelter DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbonatfaser-Technik ist beispielsweise beschrieben von Freeling und Walbot "The maize handbook" (1993) ISBN 3-540-97826-7, Springer Verlag New York).

40   Beispiel 6: Untersuchung der Expression eines rekombinanten Genproduktes in einem transformierten Organismus

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

## 36

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

20

## Northern-Hybridisierung:

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

- Zur Untersuchung des Vorliegens oder der relativen Menge an von dieser mRNA translatiertem Protein können Standardtechniken, wie
- 45 ein Western-Blot, eingesetzt werden (siehe beispielsweise Ausubel et al. (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York). Bei diesem Verfahren werden die zellulären Gesamt-

## 37

Proteine extrahiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Matrix, wie Nitrozellulose, übertragen und mit einer Sonde, wie einem Antikörper, der spezifisch an das gewünschte Protein bindet, inkubiert. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer chemilumineszenten oder kolorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen lässt. Das Vorliegen und die Menge der beobachteten Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des gewünschten, in der Zelle vorliegenden mutierten Proteins an.

**10 Beispiel 7: Analyse der Auswirkung der rekombinanten Proteine auf die Produktion des gewünschten Produktes**

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Ciliaten oder auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon A et al. (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter PA et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy JF und Cabral JMS (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz JA und Henry JD (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide -

## 38

Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

5

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

10 Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen.

Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Meta-

15 bolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical

Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und darin

20 angegebenen Literaturstellen beschrieben.

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

25 chromatographie).

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

30 wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

35 Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C

40 erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und

45 schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 Mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min

## 39

und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

5

Für die quantitative Öl-Analyse der mit dem Gpd1-Gen transformierten Arabidopsis Pflanzen wurde folgendes Protokoll angewendet:

- 10 Die Extraktion der Lipide aus Samen wird nach der Methode von Bligh & Dyer (1959) Can J Biochem Physiol 37:911 durchgeführt. Dazu werden 5 mg Arabidopsis Samen in 1,2 ml Qiagen-Microtubes (Qiagen, Hilden) auf einer Sartorius (Göttingen) Mikrowaage abgewogen. Das Samenmaterial wird mit 500 uL Chloroform/Methanol
- 15 (2:1; enthält Mono-C17-glycerin von Sigma als internen Standard) in der Rätschmühle MM300 der Firma Retsch (Haan) homogenisiert und 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 500 uL 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 erfolgt die Phasentrennung. Von der organischen Phase werden 50 µL abgenommen, mit 1500 uL Chloroform
- 20 verdünnt und 5 µL auf die Kapillaren Chromarods SIII der Firma Iatroscan (SKS, Bechenheim) aufgetragen. Nach Auftrag der Proben werden diese für 15 min in einer Dünnschichtkammer, die gesättigt ist mit 6:2:2 Chloroform: Methanol: Toluol in einem ersten Schritt aufgetrennt. Nach Ablauf der Zeit werden die Kapillaren
- 25 4 min bei Raumtemperatur getrocknet und dann für 22 min in eine Dünnschichtkammer, die gesättigt ist mit 7:3 n-Hexan:Diethyl-ether gestellt. Nach einem weiteren Trocknungsschritt für 4 min bei Raumtemperatur werden die Proben in einem Iatroscan MK-5 (SKS, Bechenheim) entsprechend Fraser & Taggart, 1988 J.
- 30 Chromatogr. 439:404 analysiert. Folgende Parameter wurden für die Messungen eingestellt: Slice width 50 msec, Treshold 20 mV, Noise 30, Skim ratio 0. Die Quantifizierung der Daten erfolgte anhand des internen Standards Mono-C17-glycerin (Sigma) sowie einer erstellten Eichkurve mit Tri-C17-glycerin (Sigma) mittels
- 35 des Programms ChromStar (SKS, Beichenheim).

Für die quantitative Bestimmung der Ölgehalte wurden T2 Samen von mehreren, unabhängigen transgenen Linien mit den Konstrukten pSUN-USP-gpd1 bzw. pGPTV-gpd1 analysiert. Von den Samenpools

40 jeder Linie wurden drei unabhängige Extraktionen durchgeführt und die Extrakte unabhängig gemessen. Aus den drei unabhängigen Messungen wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

- 45 Das Ergebnis der Messungen für die Linien mit dem Konstrukt pGPTV-gpd1 zeigte einen signifikant höheren Ölgehalt in mehreren (10) transgenen Linien (Fig. 1), verglichen mit den Messungen

## 40

von 10 Wildtyp-Pflanzen. Für das Konstrukt pSUN-USP-gpd1 werden ähnliche Ölgehalte gemessen (nicht gezeigt).

Der durchschnittliche Ölgehalt der oben aufgeführten Linien beträgt  $34,86 \pm 1,56 \%$ , während der Durchschnitt der Wildtyp-pflanzen bei  $27,75 \pm 2,64 \%$  liegt. Dies entspricht einer Steigerung des Ölgehalts um absolut  $7,1 \%$  (relativ  $25,6 \%$ ).

Zur Kontrolle der Vererbbarkeit des Effektes von gdp1 (Steigerung des Ölgehaltes) wurden T2 Samen von den Linien mit erhöhten Ölgehalten sowie von Linien mit unverändertem Ölgehalt angezogen. Jeweils 6 Pflanzen pro Linien wurden ausgebracht und die Samen auf Ölgehalt und Enzymaktivität überprüft. Die Bestimmung der Ölgehalte erfolgte entsprechend der oben ausgeführten Methodik. Die erhaltenen Werte sind in Fig. 2 dargestellt. Als Kontrollen dienen Col-0 und C24 Arabidopsis Ecotypen. C24 ist dabei ein Ecotyp, der sich durch einen höheren Ölgehalt als Col-0 auszeichnet. Es konnten Linien charakterisiert werden, die einen erhöhten Ölgehalt zu Col-0 zeigen. Damit konnte die Vererbbarkeit der Erhöhung des Ölgehaltes als Effekt der Expression des gdp1-Genes demonstriert werden.

Beispiel 8: Bestimmung von Glycerol-3-phosphatdehydrogenaseaktivität

Ein weiteres Ziel war neben der Erhöhung des Ölgehalts auch die direkte Wirkung des Enzyms in den transgenen Pflanzen nachzuweisen. Zur Bestimmung der Glycerol-3-phosphatdehydrogenase-Aktivität wurde je Pflanze zwei Arabidopsis Samenschoten geerntet und nach Geigenberger und Stitt ((1993) Planta 189:329-339) extrahiert. Dazu wurden die Schoten in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff zermahlen und mit  $200 \mu\text{L}$   $50 \text{ mM}$  HEPES pH 7,4,  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $1 \text{ mM}$  EDTA,  $1 \text{ mM}$  EGTA,  $5 \text{ mM}$  DTT,  $0,1 \%$  (w/w) Rinderserumalbumin,  $2 \text{ mM}$  Benzamidin,  $2 \text{ mM}$  Amino-n-capronsäure,  $0,5 \text{ mM}$  Phenylmethylsulfonyl,  $0,1 \%$  Triton X-100 und  $10 \%$  Glycerin (w/w) aufgenommen,  $5 \text{ min}$  zentrifugiert und der Überstand aliquotiert. Für die G3PDH Aktivität wurde die Produktion von G3P (Glycerin-3-phosphat) aus den Substraten DHAP (Dihydroxyacteonphosphat) und NADH gemessen. Dazu wurde die Oxidation von NADH bei  $340 \text{ nm}$  verfolgt.

Der Reaktionsmix zur Bestimmung der Aktivität enthielt  $50 \text{ mM}$  HEPES pH 7,4,  $4 \text{ mM}$  DHAP,  $0,2 \text{ mM}$  NADH und  $10 \mu\text{l}$  des Extraktionsmixes in einem Endvolumen von  $100 \mu\text{L}$ . Nach  $30 \text{ min}$  Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Erhitzen ( $20 \text{ min}$ ,  $95^\circ\text{C}$ ) gestoppt. In der Kontrollreaktion wurde sofort durch Erhitzen inaktiviert.

## 41

Glycerol-3-phosphat "Cycling-Assay": 10 µl des Reaktionsgemisches wurden zu 45 µl einer Lösung enthaltend 200 mM Tricin, MgCl<sub>2</sub> 5 mM (pH 8,5) gegeben und erhitzt (20 min, 95°C), um verbleibendes DHAP zu zerstören. Der Überstand wurde in eine 96-Well Microplatte  
5 überführt, mit 45 µl eines Gemisches versetzt, welches 2 units G3Pox, 130 units Katalase, 0,4 unit G3PDH und 0,12 µmol NADH enthielt. Die Reaktion wurde bei 30°C durchgeführt und die resultierende Absorption bei 340 nm in einer Anthos htII Microplatten-Lesegerät verfolgt. Reaktionsgeschwindigkeiten wurden anhand der  
10 Absorptionsabnahme in (mOD\*min<sup>-1</sup>) unter Verwendung der Biolise software berechnet (Gibon Y et al. (2002) Plant J 30(2):221-235).

Die transgenen Linien #11, #21, #41 und #67 zeigten dabei eine signifikant erhöhte Enzymaktivität im Vergleich zu Kontrollpflanzen (Fig. 3). Die Pflanzen mit erhöhtem Ölgehalt korrelieren mit  
15 den Pflanzen mit erhöhter Enzymaktivität. Damit konnte gezeigt werden, dass der erhöhte Ölgehalt auf den erhöhten Umsatz von DHAP zu G3P, der Vorstufe zur Ölsynthese, zurückzuführen ist.

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Erhöhen des Gesamtölgehalt in einem pflanz-  
 5       lichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle  
       oder Vermehrungsgut desselben, umfassend
  - a)   transgene Expression einer Glycerol-3-phosphat Dehydro-  
 10       genase aus einer Hefe in besagtem pflanzlichen Organismus  
       oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut  
       desselben und
  - b)   Auswahl von pflanzlichen Organismen, bei denen - im  
 15       Unterschied oder Vergleich zur Ausgangsorganismus - der  
       Gesamtölgehalt in dem besagten pflanzlichen Organismus  
       oder einem Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut  
       desselben erhöht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Glycerol-3-phosphat  
 20       Dehydrogenase aus einer Hefe stammt ausgewählt aus den  
       Gattungen *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Pityrosporum*, *Brettano-*  
       *myces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Trigonopsis*, *Trichosporon*, *Rhodo-*  
       *torul*, *Sporobolomyces*, *Bullera*, *Saccharomyces*, *Debaromyces*,  
       *Lipomyces*, *Hansenula*, *Endomycopsis*, *Pichia* und *Hanseniaspora*.  
 25
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die  
       Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe stammt  
       ausgewählt aus den Arten *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia*  
 30       *pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*,  
       *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Yarrowia*  
       *lipolitica*, *Emericella nidulans*, *Aspergillus nidulans*,  
       *Debaryomyces hansenii* und *Torulaspora hansenii*.  
 35
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die  
       Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase die Umsetzung von  
       Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-3-phosphat unter Ver-  
       wendung von NADH als Cosubstrat bewirkt und eine Peptid-  
       sequenz aufweist, die mindestens ein Sequenzmotiv umfasst  
       ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzmotiven bestehend aus  
 40
  - i)       GSGNWGT(A/T)IAK
  - ii)      CG(V/A)LSGAN(L/I/V)AXE(V/I)A
  - iii)     (L/V)FXRPYFXV

## 43

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase die Umsetzung von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-3-phosphat unter Verwendung von NADH als Cosubstrat bewirkt und eine Peptidsequenz aufweist, die mindestens ein Sequenzmotiv umfasst ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzmotiven bestehend aus
- 5
- iv) GSGNWGTTIAKV(V/I)AEN  
v) NT(K/R)HQNVKYL
- 10 vi) D(I/V)LVFN(I/V)PHQFL  
vii) RA(I/V)SCLKGFE  
viii) CGALSGANLA(P/T)EVA  
ix) LFHRPYFHV  
x) GLGEII(K/R)FG
- 15
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 oder 5, wobei die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase zusätzlich mindestens ein Sequenzmotiv umfasst ausgewählt aus der Gruppe von Sequenzmotiven bestehend aus
- 20
- xi) H(E/Q)NVKYL  
xii) (D/N)(I/V)(L/I)V(F/W)(V/N)(L/I/V)PHQF(V/L/I)  
xiii) (A/G)(I/V)SC(L/I)KG  
xiv) G(L/M)(L/G)E(M/I)(I/Q)(R/K/N)F(G/S/A)
- 25
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe beschrieben ist durch
- 30
- a) eine Sequenz mit der SEQ ID NO: 2, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 16, 38 oder 40, oder
- b) ein funktionelle Äquivalent von a) mit einer Identität von mindestens 60% eine Sequenz mit der SEQ ID NO: 2.
- 35
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze eine Ölpflanze ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei der Gesamtölgehalt im Samen einer Pflanze erhöht wird.
- 40
10. Transgene Expressionskassette umfassend unter Kontrolle eines in einem pflanzlichen Organismus oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle desselben funktionellen Promotors eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Glycerol-3-
- 45

## 44

phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe entsprechend den Definitionen in einem der Ansprüche 2 bis 7.

11. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 10, wobei die  
 5 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase beschrieben ist durch

  - a) eine Sequenz mit der SEQ ID NO: 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15,  
 37 oder 39 oder
  - 10 b) eine Sequenz, die sich entsprechend dem degenerierten genetischen Code von einer Sequenz mit der SEQ ID NO: 1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 37 oder 39 ableitet, oder
  - 15 c) eine Sequenz, die eine Identität von mindestens 60 % zu der Sequenz mit der SEQ ID NO: 1 aufweist.
12. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüche 10  
 20 oder 11, wobei der Promotor ein samenspezifischer Promotor ist.
13. Transgener Vektor enthaltend eine Expressionskassette nach einem der Ansprüche 10 bis 12.
- 25 14. Transgener pflanzlicher Organismus oder Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut desselben, enthaltend eine Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase aus einer Hefe entsprechend den Definitionen in einem der Ansprüche 2 bis 7 oder eine Expressionskassette nach einem der Ansprüche 10 bis 12 oder  
 30 einen Vektor nach Anspruch 13.
15. Transgener pflanzlicher Organismus nach Anspruch 14, wobei der pflanzliche Organismus ausgewählt ist aus der Gruppe der Ölpflanzen bestehend aus *Borago officinalis*, *Brassica*  
 35 *campestris*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Cannabis sativa*, *Curthamus tinctorius*, *Cocos nucifera*, *Crambe abyssinica*, *Cuphea* Arten, *Elaeis guinensis*, *Ekeis oleiferu*, *Glycine max*, *Gossypium hirsutum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum*, *Helianthus annuus*, *Linum usitatissimum*, *Oenethem*  
 40 *biennis*, *Ozea europea*, *Oryza sativa*, *Ricinus communis*, *Sesamum indicum*, *Triticum* Arten, *Zea maize*, Walnuss und Mandel.
16. Verwendung eines transgenen pflanzlichen Organismus oder  
 45 Gewebe, Organ, Teil, Zelle oder Vermehrungsgut desselben nach einem der Ansprüche 14 oder 15 zur Herstellung von Ölen, Fetten, freien Fettsäuren oder Derivaten der vorgenannten.

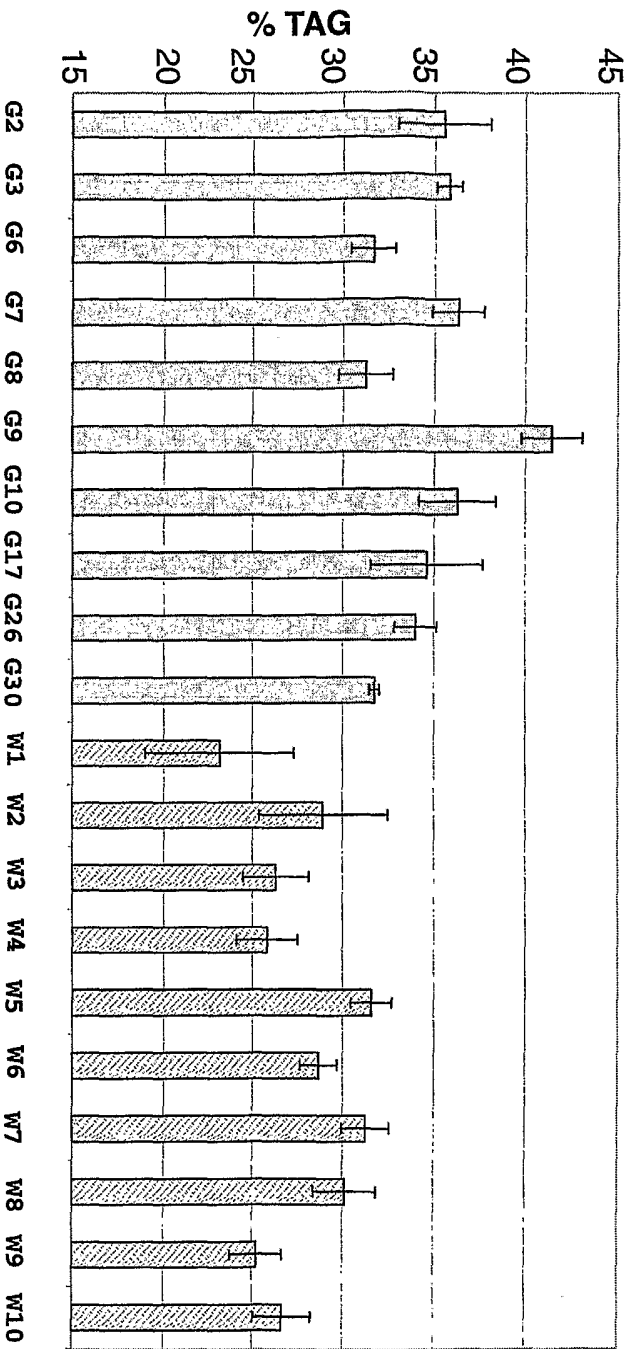


Fig. 1

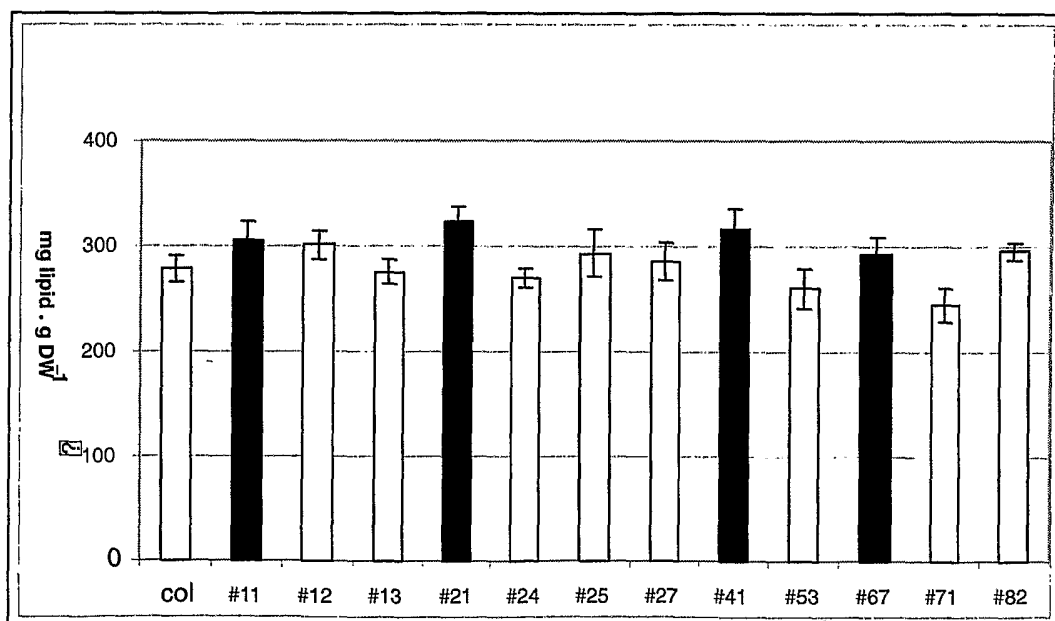


Fig. 2

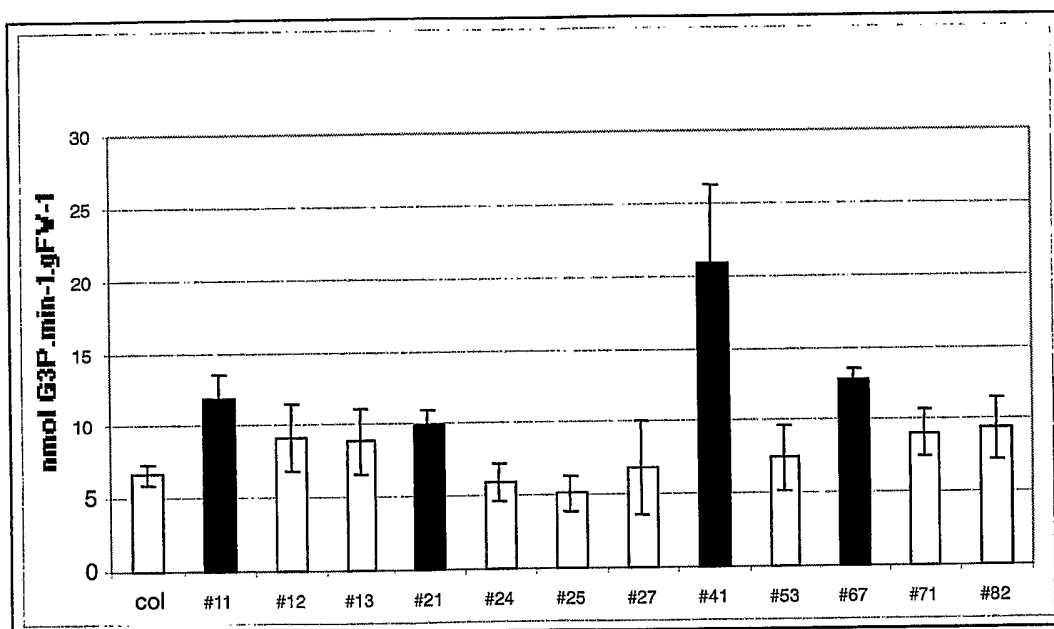


Fig. 3

## 1

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF Plant Science GmbH

&lt;120&gt; Verfahren zum Erhöhen des Ölgehaltes in Pflanzen

&lt;130&gt; NAE 2166/2002

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 40

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1176

&lt;212&gt; DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1173)

&lt;223&gt; coding for G3PDH

&lt;400&gt; 1

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| atg tct gct gct gct gat aga tta aac tta act tcc ggc cac ttg aat | 48  |
| Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| gct ggt aga aag aga agt tcc tct tct gtt tct ttg aag gct gcc gaa | 96  |
| Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| aag cct ttc aag gtt act gtg att gga tct ggt aac tgg ggt act act | 144 |
| Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| att gcc aag gtg gtt gcc gaa aat tgt aag gga tac cca gaa gtt ttc | 192 |
| Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| gct cca ata gta caa atg tgg gtg ttc gaa gaa gag atc aat ggt gaa | 240 |
| Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| aaa ttg act gaa atc ata aat act aga cat caa aac gtg aaa tac ttg | 288 |
| Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| cct ggc atc act cta ccc gac aat ttg gtt gct aat cca gac ttg att | 336 |
| Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| gat tca gtc aag gat gtc gac atc atc gtt ttc aac att cca cat caa | 384 |
| Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| ttt ttg ccc cgt atc tgt agc caa ttg aaa ggt cat gtt gat tca cac | 432 |
| Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His |     |
| 130 135 140                                                     |     |
| gtc aga gct atc tcc tgt cta aag ggt ttt gaa gtt ggt gct aaa ggt | 480 |
| Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |
| gtc caa ttg cta tcc tct tac atc act gag gaa cta ggt att caa tgt | 528 |
| Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys |     |
| 165 170 175                                                     |     |

## 2

ggt gct cta tct ggt gct aac att gcc acc gaa gtc gct caa gaa cac 576  
 Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His  
 180 185 190

tgg tct gaa aca aca gtt gct tac cac att cca aag gat ttc aga ggc 624  
 Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly  
 195 200 205

gag ggc aag gac gtc gac cat aag gtt cta aag gcc ttg ttc cac aga 672  
 Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg  
 210 215 220

cct tac ttc cac gtt agt gtc atc gaa gat gtt gct ggt atc tcc atc 720  
 Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile  
 225 230 235 240

tgt ggt gct ttg aag aac gtt gtt gcc tta ggt tgt ggt ttc gtc gaa 768  
 Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu  
 245 250 255

ggt cta ggc tgg ggt aac aac gct tct gct gcc atc caa aga gtc ggt 816  
 Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly  
 260 265 270

ttg ggt gag atc atc aga ttc ggt caa atg ttt ttc cca gaa tct aga 864  
 Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg  
 275 280 285

gaa gaa aca tac tac caa gag tct gct ggt gtt gct gat ttg atc acc 912  
 Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr  
 290 295 300

acc tgc gct ggt ggt aga aac gtc aag gtt gct agg cta atg gct act 960  
 Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr  
 305 310 315 320

tct ggt aag gac gcc tgg gaa tgt gaa aag gag ttg ttg aat ggc caa 1008  
 Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln  
 325 330 335

tcc gct caa ggt tta att acc tgc aaa gaa gtt cac gaa tgg ttg gaa 1056  
 Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu  
 340 345 350

aca tgt ggc tct gtc gaa gac ttc cca tta ttt gaa gcc gta tac caa 1104  
 Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln  
 355 360 365

atc gtt tac aac aac tac cca atg aag aac ctg ccg gac atg att gaa 1152  
 Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu  
 370 375 380

gaa tta gat cta cat gaa gat tag 1176  
 Glu Leu Asp Leu His Glu Asp  
 385 390

<210> 2  
 <211> 391  
 <212> PRT  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*  
 <400> 2  
 Met Ser Ala Ala Ala Asp Arg Leu Asn Leu Thr Ser Gly His Leu Asn  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Arg Lys Arg Ser Ser Ser Ser Val Ser Leu Lys Ala Ala Glu  
 20 25 30

## 3

Lys Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr  
                   35                                  40                                  45  
 Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Cys Lys Gly Tyr Pro Glu Val Phe  
           50                                  55                                  60  
 Ala Pro Ile Val Gln Met Trp Val Phe Glu Glu Glu Ile Asn Gly Glu  
   65                                  70                                  75                                  80  
 Lys Leu Thr Glu Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr Leu  
                                   85                                  90                                  95  
 Pro Gly Ile Thr Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile  
                                  100                                 105                                 110  
 Asp Ser Val Lys Asp Val Asp Ile Ile Val Phe Asn Ile Pro His Gln  
                                  115                                 120                                 125  
 Phe Leu Pro Arg Ile Cys Ser Gln Leu Lys Gly His Val Asp Ser His  
   130                                 135                                 140  
 Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Ala Lys Gly  
  145                                 150                                 155                                 160  
 Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Leu Gly Ile Gln Cys  
                                  165                                 170                                 175  
 Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Ile Ala Thr Glu Val Ala Gln Glu His  
                                  180                                 185                                 190  
 Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Lys Asp Phe Arg Gly  
                                  195                                 200                                 205  
 Glu Gly Lys Asp Val Asp His Lys Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg  
   210                                 215                                 220  
 Pro Tyr Phe His Val Ser Val Ile Glu Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile  
  225                                 230                                 235                                 240  
 Cys Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Glu  
                                  245                                 250                                 255  
 Gly Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly  
                                  260                                 265                                 270  
 Leu Gly Glu Ile Ile Arg Phe Gly Gln Met Phe Phe Pro Glu Ser Arg  
                                  275                                 280                                 285  
 Glu Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr  
   290                                 295                                 300  
 Thr Cys Ala Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Leu Met Ala Thr  
  305                                 310                                 315                                 320  
 Ser Gly Lys Asp Ala Trp Glu Cys Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln  
                                  325                                 330                                 335  
 Ser Ala Gln Gly Leu Ile Thr Cys Lys Glu Val His Glu Trp Leu Glu  
                                  340                                 345                                 350  
 Thr Cys Gly Ser Val Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln  
                                  355                                 360                                 365  
 Ile Val Tyr Asn Asn Tyr Pro Met Lys Asn Leu Pro Asp Met Ile Glu  
   370                                 375                                 380  
 Glu Leu Asp Leu His Glu Asp  
  385                                 390

<210> 3  
 <211> 1299  
 <212> DNA  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1296)  
 <223> coding for G3PDH  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (145)..(1296)  
 <223> coding for G3PDH (alternative Start codon)  
 <400> 3  
 atg ctt gct gtc aga aga tta aca aga tac aca ttc ctt aag cga acg 48  
 Met Leu Ala Val Arg Arg Leu Thr Arg Tyr Thr Phe Leu Lys Arg Thr  
 1 5 10 15  
 cat ccg gtg tta tat act cgt cgt gca tat aaa att ttg cct tca aga 96  
 His Pro Val Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Tyr Lys Ile Leu Pro Ser Arg  
 20 25 30  
 tct act ttc cta aga aga tca tta tta caa aca caa ctg cac tca aag 144  
 Ser Thr Phe Leu Arg Arg Ser Leu Leu Gln Thr Gln Leu His Ser Lys  
 35 40 45  
 atg act gct cat act aat atc aaa cag cac aaa cac tgt cat gag gac 192  
 Met Thr Ala His Thr Asn Ile Lys Gln His Lys His Cys His Glu Asp  
 50 55 60  
 cat cct atc aga aga tcg gac tct gcc gtg tca att gta cat ttg aaa 240  
 His Pro Ile Arg Arg Ser Asp Ser Ala Val Ser Ile Val His Leu Lys  
 65 70 75 80  
 cgt gcg ccc ttc aag gtt aca gtg att ggt tct ggt aac tgg ggg acc 288  
 Arg Ala Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr  
 85 90 95  
 acc atc gcc aaa gtc att gcg gaa aac aca gaa ttg cat tcc cat atc 336  
 Thr Ile Ala Lys Val Ile Ala Glu Asn Thr Glu Leu His Ser His Ile  
 100 105 110  
 ttc gag cca gag gtg aga atg tgg gtt ttt gat gaa aag atc ggc gac 384  
 Phe Glu Pro Glu Val Arg Met Trp Val Phe Asp Glu Lys Ile Gly Asp  
 115 120 125  
 gaa aat ctg acg gat atc ata aat aca aga cac cag aac gtt aaa tat 432  
 Glu Asn Leu Thr Asp Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr  
 130 135 140  
 cta ccc aat att gac ctg ccc cat aat cta gtg gcc gat cct gat ctt 480  
 Leu Pro Asn Ile Asp Leu Pro His Asn Leu Val Ala Asp Pro Asp Leu  
 145 150 155 160  
 tta cac tcc atc aag ggt gct gac atc ctt gtt ttc aac atc cct cat 528  
 Leu His Ser Ile Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Phe Asn Ile Pro His  
 165 170 175  
 caa ttt tta cca aac ata gtc aaa caa ttg caa ggc cac gtg gcc cct 576  
 Gln Phe Leu Pro Asn Ile Val Lys Gln Leu Gln Gly His Val Ala Pro  
 180 185 190  
 cat gta agg gcc atc tcg tgt cta aaa ggg ttc gag ttg ggc tcc aag 624  
 His Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Leu Gly Ser Lys  
 195 200 205

## 5

ggt gtg caa ttg cta tcc tcc tat gtt act gat gag tta gga atc caa 672  
 Gly Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Val Thr Asp Glu Leu Gly Ile Gln  
 210 215 220

tgt ggc gca cta tct ggt gca aac ttg gca ccg gaa gtg gcc aag gag 720  
 Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu  
 225 230 235 240

cat tgg tcc gaa acc acc gtg gct tac caa cta cca aag gat tat caa 768  
 His Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Leu Pro Lys Asp Tyr Gln  
 245 250 255

ggt gat ggc aag gat gta gat cat aag att ttg aaa ttg ctg ttc cac 816  
 Gly Asp Gly Lys Asp Val Asp His Lys Ile Leu Lys Leu Leu Phe His  
 260 265 270

aga cct tac ttc cac gtc aat gtc atc gat gat gtt gct ggt ata tcc 864  
 Arg Pro Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser  
 275 280 285

att gcc ggt gcc ttg aag aac gtc gtg gca ctt gca tgt ggt ttc gta 912  
 Ile Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Ala Cys Gly Phe Val  
 290 295 300

gaa ggt atg gga tgg ggt aac aat gcc tcc gca gcc att caa agg ctg 960  
 Glu Gly Met Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Leu  
 305 310 315 320

ggt tta ggt gaa att atc aag ttc ggt aga atg ttt ttc cca gaa tcc 1008  
 Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser  
 325 330 335

aaa gtc gag acc tac tat caa gaa tcc gct ggt gtt gca gat ctg atc 1056  
 Lys Val Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile  
 340 345 350

acc acc tgc tca ggc ggt aga aac gtc aag gtt gcc aca tac atg gcc 1104  
 Thr Thr Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Thr Tyr Met Ala  
 355 360 365

aag acc ggt aag tca gcc ttg gaa gca gaa aag gaa ttg ctt aac ggt 1152  
 Lys Thr Gly Lys Ser Ala Leu Glu Ala Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly  
 370 375 380

caa tcc gcc caa ggg ata atc aca tgc aga gaa gtt cac gag tgg cta 1200  
 Gln Ser Ala Gln Gly Ile Ile Thr Cys Arg Glu Val His Glu Trp Leu  
 385 390 395 400

caa aca tgt gag ttg acc caa gaa ttc cca att att cga ggc agt cta 1248  
 Gln Thr Cys Glu Leu Thr Gln Glu Phe Pro Ile Ile Arg Gly Ser Leu  
 405 410 415

cca gat agt cta caa caa cgt ccg cat gga aga cct acc gga gat gat 1296  
 Pro Asp Ser Leu Gln Gln Arg Pro His Gly Arg Pro Thr Gly Asp Asp  
 420 425 430

tga 1299

<210> 4  
 <211> 432  
 <212> PRT  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*  
 <400> 4  
 Met Leu Ala Val Arg Arg Leu Thr Arg Tyr Thr Phe Leu Lys Arg Thr  
 1 5 10 15

## 6

His Pro Val Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Tyr Lys Ile Leu Pro Ser Arg  
                   20                  25                  30  
 Ser Thr Phe Leu Arg Arg Ser Leu Leu Gln Thr Gln Leu His Ser Lys  
                   35                  40                  45  
 Met Thr Ala His Thr Asn Ile Lys Gln His Lys His Cys His Glu Asp  
                   50                  55                  60  
 His Pro Ile Arg Arg Ser Asp Ser Ala Val Ser Ile Val His Leu Lys  
                   65                  70                  75                  80  
 Arg Ala Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr  
                   85                  90                  95  
 Thr Ile Ala Lys Val Ile Ala Glu Asn Thr Glu Leu His Ser His Ile  
                   100                  105                  110  
 Phe Glu Pro Glu Val Arg Met Trp Val Phe Asp Glu Lys Ile Gly Asp  
                   115                  120                  125  
 Glu Asn Leu Thr Asp Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr  
                   130                  135                  140  
 Leu Pro Asn Ile Asp Leu Pro His Asn Leu Val Ala Asp Pro Asp Leu  
                   145                  150                  155                  160  
 Leu His Ser Ile Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Phe Asn Ile Pro His  
                   165                  170                  175  
 Gln Phe Leu Pro Asn Ile Val Lys Gln Leu Gln Gly His Val Ala Pro  
                   180                  185                  190  
 His Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Leu Gly Ser Lys  
                   195                  200                  205  
 Gly Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Val Thr Asp Glu Leu Gly Ile Gln  
                   210                  215                  220  
 Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu  
                   225                  230                  235                  240  
 His Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Leu Pro Lys Asp Tyr Gln  
                   245                  250                  255  
 Gly Asp Gly Lys Asp Val Asp His Lys Ile Leu Lys Leu Leu Phe His  
                   260                  265                  270  
 Arg Pro Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser  
                   275                  280                  285  
 Ile Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Ala Cys Gly Phe Val  
                   290                  295                  300  
 Glu Gly Met Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Leu  
                   305                  310                  315                  320  
 Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser  
                   325                  330                  335  
 Lys Val Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile  
                   340                  345                  350  
 Thr Thr Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Thr Tyr Met Ala  
                   355                  360                  365  
 Lys Thr Gly Lys Ser Ala Leu Glu Ala Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly  
                   370                  375                  380  
 Gln Ser Ala Gln Gly Ile Ile Thr Cys Arg Glu Val His Glu Trp Leu  
                   385                  390                  395                  400  
 Gln Thr Cys Glu Leu Thr Gln Glu Phe Pro Ile Ile Arg Gly Ser Leu  
                   405                  410                  415  
 Pro Asp Ser Leu Gln Gln Arg Pro His Gly Arg Pro Thr Gly Asp Asp  
                   420                  425                  430

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 384

&lt;212&gt; PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

&lt;400&gt; 5

```

Met Thr Ala His Thr Asn Ile Lys Gln His Lys His Cys His Glu Asp
 1           5           10           15
His Pro Ile Arg Arg Ser Asp Ser Ala Val Ser Ile Val His Leu Lys
          20           25           30
Arg Ala Pro Phe Lys Val Thr Val Ile Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr
          35           40           45
Thr Ile Ala Lys Val Ile Ala Glu Asn Thr Glu Leu His Ser His Ile
          50           55           60
Phe Glu Pro Glu Val Arg Met Trp Val Phe Asp Glu Lys Ile Gly Asp
          65           70           75           80
Glu Asn Leu Thr Asp Ile Ile Asn Thr Arg His Gln Asn Val Lys Tyr
          85           90           95
Leu Pro Asn Ile Asp Leu Pro His Asn Leu Val Ala Asp Pro Asp Leu
          100          105          110
Leu His Ser Ile Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Phe Asn Ile Pro His
          115          120          125
Gln Phe Leu Pro Asn Ile Val Lys Gln Leu Gln Gly His Val Ala Pro
          130          135          140
His Val Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Leu Gly Ser Lys
          145          150          155          160
Gly Val Gln Leu Leu Ser Ser Tyr Val Thr Asp Glu Leu Gly Ile Gln
          165          170          175
Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu
          180          185          190
His Trp Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Leu Pro Lys Asp Tyr Gln
          195          200          205
Gly Asp Gly Lys Asp Val Asp His Lys Ile Leu Lys Leu Leu Phe His
          210          215          220
Arg Pro Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser
          225          230          235          240
Ile Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Ala Cys Gly Phe Val
          245          250          255
Glu Gly Met Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ser Ala Ala Ile Gln Arg Leu
          260          265          270
Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser
          275          280          285
Lys Val Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile
          290          295          300
Thr Thr Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Thr Tyr Met Ala
          305          310          315          320
Lys Thr Gly Lys Ser Ala Leu Glu Ala Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly
          325          330          335
Gln Ser Ala Gln Gly Ile Ile Thr Cys Arg Glu Val His Glu Trp Leu
          340          345          350
Gln Thr Cys Glu Leu Thr Gln Glu Phe Pro Ile Ile Arg Gly Ser Leu
          355          360          365
Pro Asp Ser Leu Gln Gln Arg Pro His Gly Arg Pro Thr Gly Asp Asp
          370          375          380

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1122

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Schizosaccharomyces pombe

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1119)

&lt;223&gt; coding for G3PDH

&lt;400&gt; 6

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| atg act gtg gct gct ttg aac aaa ctc agc gct ctc tcc gga agt att | 48  |
| Met Thr Val Ala Ala Leu Asn Lys Leu Ser Ala Leu Ser Gly Ser Ile |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| caa aaa tct ttt tca cct aaa ctt att tct gtt ggt atc atc gga tca | 96  |
| Gln Lys Ser Phe Ser Pro Lys Leu Ile Ser Val Gly Ile Ile Gly Ser |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| gga aat tgg gga acc gct att gct aaa ata tgt ggt gaa aat gcc aag | 144 |
| Gly Asn Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Cys Gly Glu Asn Ala Lys |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| gct cat cct gat att ttc cat cct caa gta cac atg tgg atg tat gaa | 192 |
| Ala His Pro Asp Ile Phe His Pro Gln Val His Met Trp Met Tyr Glu |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| gag aag att caa cat gag gga aaa gag tgc aat ctc acg gaa gtt ttt | 240 |
| Glu Lys Ile Gln His Glu Gly Lys Glu Cys Asn Leu Thr Glu Val Phe |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| aac act act cat gaa aac gtt aaa tat ctc aaa ggt atc aaa tgc cct | 288 |
| Asn Thr Thr His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Lys Gly Ile Lys Cys Pro |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| tct aac gtc ttc gca aac ccg gac att cgt gat gta ggt tca cgt agc | 336 |
| Ser Asn Val Phe Ala Asn Pro Asp Ile Arg Asp Val Gly Ser Arg Ser |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| gac att ctg gta tgg gtt ctc cct cac cag ttc gtt gtg cgt att tgc | 384 |
| Asp Ile Leu Val Trp Val Leu Pro His Gln Phe Val Val Arg Ile Cys |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| aat caa ttg aag gga tgc cta aag aag gat gct gtt gca att tca tgc | 432 |
| Asn Gln Leu Lys Gly Cys Leu Lys Lys Asp Ala Val Ala Ile Ser Cys |     |
| 130 135 140                                                     |     |
| atc aaa ggt gta tct gtc acc aag gac cgt gtt cgc ctc ttt tct gat | 480 |
| Ile Lys Gly Val Ser Val Thr Lys Asp Arg Val Arg Leu Phe Ser Asp |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |
| att atc gaa gaa aac acg gga atg tat tgt ggc gtt ctc tct ggc gcc | 528 |
| Ile Ile Glu Glu Asn Thr Gly Met Tyr Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala |     |
| 165 170 175                                                     |     |
| aac att gcc agc gaa gtt gct caa gag aag ttt tgc gaa act act atc | 576 |
| Asn Ile Ala Ser Glu Val Ala Gln Glu Lys Phe Cys Glu Thr Thr Ile |     |
| 180 185 190                                                     |     |
| gga tat ttg cct aat agt tct gtt aat ccc cgc tat act cct aag act | 624 |
| Gly Tyr Leu Pro Asn Ser Ser Val Asn Pro Arg Tyr Thr Pro Lys Thr |     |
| 195 200 205                                                     |     |
| atc caa gct ttg ttt aac cgt ccc tac ttc cgt gtc aac att gtt gag | 672 |
| Ile Gln Ala Leu Phe Asn Arg Pro Tyr Phe Arg Val Asn Ile Val Glu |     |
| 210 215 220                                                     |     |
| gat gtt cct ggt gtt gct ttg ggc ggt gca ctc aag aat atc gtc gct | 720 |
| Asp Val Pro Gly Val Ala Leu Gly Gly Ala Leu Lys Asn Ile Val Ala |     |
| 225 230 235 240                                                 |     |
| gtc gct gcc ggt att att gat gga ctt gaa ttg gga gat aat acc aaa | 768 |
| Val Ala Ala Gly Ile Ile Asp Gly Leu Glu Leu Gly Asp Asn Thr Lys |     |
| 245 250 255                                                     |     |

tct gct gtt atg cgc att ggc ctt ctg gaa atg cag aaa ttc ggc agg 816  
 Ser Ala Val Met Arg Ile Gly Leu Leu Glu Met Gln Lys Phe Gly Arg  
 260 265 270

atg ttt ttc gat tgt aag cct ctt act atg agc gag gaa tct tgt ggc 864  
 Met Phe Phe Asp Cys Lys Pro Leu Thr Met Ser Glu Glu Ser Cys Gly  
 275 280 285

ata gcc gat tta att aca act tgc tta ggc ggc cgt aac cac aaa tgc 912  
 Ile Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys Leu Gly Gly Arg Asn His Lys Cys  
 290 295 300

gct gtg gca ttt gtc aag aca gga aag ccc atg cat gtt gtt gaa caa 960  
 Ala Val Ala Phe Val Lys Thr Gly Lys Pro Met His Val Val Glu Gln  
 305 310 315 320

gaa ctt ctt gat ggt cag aag ttg caa ggt gca gct acc gcg aag gag 1008  
 Glu Leu Leu Asp Gly Gln Lys Leu Gln Gly Ala Ala Thr Ala Lys Glu  
 325 330 335

gtt tat gag ttc ctt gat aac cag aat aag gta agc gaa ttc cca ttg 1056  
 Val Tyr Glu Phe Leu Asp Asn Gln Asn Lys Val Ser Glu Phe Pro Leu  
 340 345 350

ttt aca gct gtt tat cgc att gtt tat gag gga ctt cca cct aat aag 1104  
 Phe Thr Ala Val Tyr Arg Ile Val Tyr Glu Gly Leu Pro Pro Asn Lys  
 355 360 365

ctt ctg gag gct att taa 1122  
 Leu Leu Glu Ala Ile  
 370

<210> 7  
 <211> 373  
 <212> PRT  
 <213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 7  
 Met Thr Val Ala Ala Leu Asn Lys Leu Ser Ala Leu Ser Gly Ser Ile  
 1 5 10 15  
 Gln Lys Ser Phe Ser Pro Lys Leu Ile Ser Val Gly Ile Ile Gly Ser  
 20 25 30  
 Gly Asn Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Cys Gly Glu Asn Ala Lys  
 35 40 45  
 Ala His Pro Asp Ile Phe His Pro Gln Val His Met Trp Met Tyr Glu  
 50 55 60  
 Glu Lys Ile Gln His Glu Gly Lys Glu Cys Asn Leu Thr Glu Val Phe  
 65 70 75 80  
 Asn Thr Thr His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Lys Gly Ile Lys Cys Pro  
 85 90 95  
 Ser Asn Val Phe Ala Asn Pro Asp Ile Arg Asp Val Gly Ser Arg Ser  
 100 105 110  
 Asp Ile Leu Val Trp Val Leu Pro His Gln Phe Val Val Arg Ile Cys  
 115 120 125  
 Asn Gln Leu Lys Gly Cys Leu Lys Lys Asp Ala Val Ala Ile Ser Cys  
 130 135 140  
 Ile Lys Gly Val Ser Val Thr Lys Asp Arg Val Arg Leu Phe Ser Asp  
 145 150 155 160

## 10

Ile Ile Glu Glu Asn Thr Gly Met Tyr Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala  
 165 170 175  
 Asn Ile Ala Ser Glu Val Ala Gln Glu Lys Phe Cys Glu Thr Thr Ile  
 180 185 190  
 Gly Tyr Leu Pro Asn Ser Ser Val Asn Pro Arg Tyr Thr Pro Lys Thr  
 195 200 205  
 Ile Gln Ala Leu Phe Asn Arg Pro Tyr Phe Arg Val Asn Ile Val Glu  
 210 215 220  
 Asp Val Pro Gly Val Ala Leu Gly Gly Ala Leu Lys Asn Ile Val Ala  
 225 230 235 240  
 Val Ala Ala Gly Ile Ile Asp Gly Leu Glu Leu Gly Asp Asn Thr Lys  
 245 250 255  
 Ser Ala Val Met Arg Ile Gly Leu Leu Glu Met Gln Lys Phe Gly Arg  
 260 265 270  
 Met Phe Phe Asp Cys Lys Pro Leu Thr Met Ser Glu Glu Ser Cys Gly  
 275 280 285  
 Ile Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys Leu Gly Gly Arg Asn His Lys Cys  
 290 295 300  
 Ala Val Ala Phe Val Lys Thr Gly Lys Pro Met His Val Val Glu Gln  
 305 310 315 320  
 Glu Leu Leu Asp Gly Gln Lys Leu Gln Gly Ala Ala Thr Ala Lys Glu  
 325 330 335  
 Val Tyr Glu Phe Leu Asp Asn Gln Asn Lys Val Ser Glu Phe Pro Leu  
 340 345 350  
 Phe Thr Ala Val Tyr Arg Ile Val Tyr Glu Gly Leu Pro Pro Asn Lys  
 355 360 365  
 Leu Leu Glu Ala Ile  
 370

<210> 8  
 <211> 1155  
 <212> DNA  
 <213> Schizosaccharomyces pombe  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1152)  
 <223> coding for G3PDH

<400> 8  
 atg tct gga tat ggt caa caa ggt gtt tct gct gcc aac atc gac agc 48  
 Met Ser Gly Tyr Gly Gln Gln Gly Val Ser Ala Ala Asn Ile Asp Ser  
 1 5 10 15  
 atc cgc ccc aag aaa cgt ttg tca att ggt gta gtt ggc tcc ggt aac 96  
 Ile Arg Pro Lys Lys Arg Leu Ser Ile Gly Val Val Gly Ser Gly Asn  
 20 25 30  
 tgg ggt act gcc att gcc aag att tgc ggt gaa aat gcc cgt gcc cac 144  
 Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Cys Gly Glu Asn Ala Arg Ala His  
 35 40 45  
 ggt cac cat ttc aga ggt aag ggg cgc atg tgg gtc ttt gag gag gag 192  
 Gly His His Phe Arg Gly Lys Gly Arg Met Trp Val Phe Glu Glu Glu  
 50 55 60

## 11

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| att gag tac aag ggt gag aag aga aag ctc acc gaa gta ttc aac gaa | 240  |
| Ile Glu Tyr Lys Gly Glu Lys Arg Lys Leu Thr Glu Val Phe Asn Glu |      |
| 65 70 75 80                                                     |      |
| gct cac gag aat gtc aaa tac tta ccc ggc atc gaa tgc cct ccc aac | 288  |
| Ala His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Glu Cys Pro Pro Asn |      |
| 85 90 95                                                        |      |
| gtt att gcc gtc ccc gat gtt cgt gag gtc gct aga cgt gcc gac atc | 336  |
| Val Ile Ala Val Pro Asp Val Arg Glu Val Ala Arg Arg Ala Asp Ile |      |
| 100 105 110                                                     |      |
| ctt gtc ttt gtc gtt cct cat caa ttt att gaa cgc gtt tgg cac caa | 384  |
| Leu Val Phe Val Val Pro His Gln Phe Ile Glu Arg Val Trp His Gln |      |
| 115 120 125                                                     |      |
| atg gtc ggt ctc att cgc cct ggt gcc gtt ggt att tcc tgt atc aag | 432  |
| Met Val Gly Leu Ile Arg Pro Gly Ala Val Gly Ile Ser Cys Ile Lys |      |
| 130 135 140                                                     |      |
| ggt gtt gct gtc agc aag gaa ggc tcg ctt tac tct gag gtt atc agc | 480  |
| Gly Val Ala Val Ser Lys Glu Gly Ser Leu Tyr Ser Glu Val Ile Ser |      |
| 145 150 155 160                                                 |      |
| gag aaa ctc ggt att tac tgt ggt gtt ctt tct ggt gct aac gtt gca | 528  |
| Glu Lys Leu Gly Ile Tyr Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn Val Ala |      |
| 165 170 175                                                     |      |
| aac gaa gtt gcc cgt gag caa ttc tgt gag act act att ggt ttc aac | 576  |
| Asn Glu Val Ala Arg Glu Gln Phe Cys Glu Thr Thr Ile Gly Phe Asn |      |
| 180 185 190                                                     |      |
| cct cct aat gaa gtt gat atc cct cgc gag caa atc gcc gcc gtc tct | 624  |
| Pro Pro Asn Glu Val Asp Ile Pro Arg Glu Gln Ile Ala Ala Val Ser |      |
| 195 200 205                                                     |      |
| gat cgc cct tac ttc tca gtt gtc tcc gtt gac gac gtt gcc ggt gtc | 672  |
| Asp Arg Pro Tyr Phe Ser Val Val Ser Val Asp Asp Val Ala Gly Val |      |
| 210 215 220                                                     |      |
| gcc ttg ggt ggt gct ttg aag aac gta gtt gcc atg gcc gtt ggt ttc | 720  |
| Ala Leu Gly Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Met Ala Val Gly Phe |      |
| 225 230 235 240                                                 |      |
| gct gat ggt ttg gaa tgg ggc ggt aat acc aag gcc gct att atg cgt | 768  |
| Ala Asp Gly Leu Glu Trp Gly Gly Asn Thr Lys Ala Ala Ile Met Arg |      |
| 245 250 255                                                     |      |
| cgt ggt ttg ttg gag atg caa aag ttt gct act acc ttc ttc gac tct | 816  |
| Arg Gly Leu Leu Glu Met Gln Lys Phe Ala Thr Thr Phe Phe Asp Ser |      |
| 260 265 270                                                     |      |
| gat cct cgt acc atg gtt gag caa tct tgc ggt atc gct gac ttg gtc | 864  |
| Asp Pro Arg Thr Met Val Glu Gln Ser Cys Gly Ile Ala Asp Leu Val |      |
| 275 280 285                                                     |      |
| act tct tgt ttg ggt ggc cgt aac aat cgt tgt gct gaa gca ttt gtc | 912  |
| Thr Ser Cys Leu Gly Gly Arg Asn Asn Arg Cys Ala Glu Ala Phe Val |      |
| 290 295 300                                                     |      |
| aag act ggt aaa tct tta gag acg ctt gaa aaa gag ctc tta ggt ggt | 960  |
| Lys Thr Gly Lys Ser Leu Glu Thr Leu Glu Lys Glu Leu Leu Gly Gly |      |
| 305 310 315 320                                                 |      |
| caa ctt ctt caa gga gct gcc act tcc aag gat gtt cat gaa ttc ctt | 1008 |
| Gln Leu Leu Gln Gly Ala Ala Thr Ser Lys Asp Val His Glu Phe Leu |      |
| 325 330 335                                                     |      |

## 12

ctc acc aag gat atg gtc aag gat ttc ccc ttg ttc act gcc gtt tat 1056  
 Leu Thr Lys Asp Met Val Lys Asp Phe Pro Leu Phe Thr Ala Val Tyr  
 340 345 350

aac att tcc tat gaa gac atg gat ccc aag gat ttg atc atc gtc ctt 1104  
 Asn Ile Ser Tyr Glu Asp Met Asp Pro Lys Asp Leu Ile Ile Val Leu  
 355 360 365

caa ccc ctt aag gag gac tct gag aac gag ggc ggt act gaa acc gag 1152  
 Gln Pro Leu Lys Glu Asp Ser Glu Asn Glu Gly Gly Thr Glu Thr Glu  
 370 375 380

taa 1155

<210> 9  
 <211> 384  
 <212> PRT  
 <213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 9  
 Met Ser Gly Tyr Gly Gln Gln Gly Val Ser Ala Ala Asn Ile Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Ile Arg Pro Lys Lys Arg Leu Ser Ile Gly Val Val Gly Ser Gly Asn  
 20 25 30  
 Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Cys Gly Glu Asn Ala Arg Ala His  
 35 40 45  
 Gly His His Phe Arg Gly Lys Gly Arg Met Trp Val Phe Glu Glu Glu  
 50 55 60  
 Ile Glu Tyr Lys Gly Glu Lys Arg Lys Leu Thr Glu Val Phe Asn Glu  
 65 70 75 80  
 Ala His Glu Asn Val Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Glu Cys Pro Pro Asn  
 85 90 95  
 Val Ile Ala Val Pro Asp Val Arg Glu Val Ala Arg Arg Ala Asp Ile  
 100 105 110  
 Leu Val Phe Val Val Pro His Gln Phe Ile Glu Arg Val Trp His Gln  
 115 120 125  
 Met Val Gly Leu Ile Arg Pro Gly Ala Val Gly Ile Ser Cys Ile Lys  
 130 135 140  
 Gly Val Ala Val Ser Lys Glu Gly Ser Leu Tyr Ser Glu Val Ile Ser  
 145 150 155 160  
 Glu Lys Leu Gly Ile Tyr Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn Val Ala  
 165 170 175  
 Asn Glu Val Ala Arg Glu Gln Phe Cys Glu Thr Thr Ile Gly Phe Asn  
 180 185 190  
 Pro Pro Asn Glu Val Asp Ile Pro Arg Glu Gln Ile Ala Ala Val Ser  
 195 200 205  
 Asp Arg Pro Tyr Phe Ser Val Val Ser Val Asp Asp Val Ala Gly Val  
 210 215 220  
 Ala Leu Gly Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Met Ala Val Gly Phe  
 225 230 235 240  
 Ala Asp Gly Leu Glu Trp Gly Gly Asn Thr Lys Ala Ala Ile Met Arg  
 245 250 255  
 Arg Gly Leu Leu Glu Met Gln Lys Phe Ala Thr Thr Phe Phe Asp Ser  
 260 265 270

## 13

Asp Pro Arg Thr Met Val Glu Gln Ser Cys Gly Ile Ala Asp Leu Val  
 275 280 285  
 Thr Ser Cys Leu Gly Gly Arg Asn Asn Arg Cys Ala Glu Ala Phe Val  
 290 295 300  
 Lys Thr Gly Lys Ser Leu Glu Thr Leu Glu Lys Glu Leu Leu Gly Gly  
 305 310 315 320  
 Gln Leu Leu Gln Gly Ala Ala Thr Ser Lys Asp Val His Glu Phe Leu  
 325 330 335  
 Leu Thr Lys Asp Met Val Lys Asp Phe Pro Leu Phe Thr Ala Val Tyr  
 340 345 350  
 Asn Ile Ser Tyr Glu Asp Met Asp Pro Lys Asp Leu Ile Ile Val Leu  
 355 360 365  
 Gln Pro Leu Lys Glu Asp Ser Glu Asn Glu Gly Gly Thr Glu Thr Glu  
 370 375 380

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 1197

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Yarrowia lipolytica

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1194)

&lt;223&gt; coding for G3PDH

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (40)..(1194)

&lt;400&gt; 10

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| atg agc gct cta ctt aga tcg tcc ctg cgt ttt aaa cac atg tcc gcc | 48  |
| Met Ser Ala Leu Leu Arg Ser Ser Leu Arg Phe Lys His Met Ser Ala |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| gtc aac cgt ctc aca caa cag ctt cga ctg ctg acc gcc tcc gcg cct | 96  |
| Val Asn Arg Leu Thr Gln Gln Leu Arg Leu Leu Thr Ala Ser Ala Pro |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| ctc agc gca gcc aac acc gcc ggc aag gct cct ttc aag gtc gcc gtt | 144 |
| Leu Ser Ala Ala Asn Thr Ala Gly Lys Ala Pro Phe Lys Val Ala Val |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| gtt ggt tct ggt aac tgg gga acc acc gtc gcc aag att gtc gcc gag | 192 |
| Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Val Ala Lys Ile Val Ala Glu |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| aac tgc act gct cac ccc gag ctc ttt gag ccc gag gtt cga gtc tgg | 240 |
| Asn Cys Thr Ala His Pro Glu Leu Phe Glu Pro Glu Val Arg Val Trp |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| gtt cga gaa gag aag gtc aac ggc aag aac ctg acc gac att ttc aac | 288 |
| Val Arg Glu Glu Lys Val Asn Gly Lys Asn Leu Thr Asp Ile Phe Asn |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| gct gag cac gag aac gtg cga tac ctc cct aaa atc aaa ctt cct cac | 336 |
| Ala Glu His Glu Asn Val Arg Tyr Leu Pro Lys Ile Lys Leu Pro His |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| aac ctg atc gcc gag ccg gat ctg ctc aag gcc gtc gag ggt gcc aac | 384 |
| Asn Leu Ile Ala Glu Pro Asp Leu Leu Lys Ala Val Glu Gly Ala Asn |     |
| 115 120 125                                                     |     |

## 14

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| atc atc gtc ttc aac ctg ccc cat cag ttc ctg gct ggt gtc tgc aag | 432  |
| Ile Ile Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe Leu Ala Gly Val Cys Lys |      |
| 130 135 140                                                     |      |
| cag ctc aag ggc cac gtc aac ccc aag gct aga gcc atc tcc tgc ctc | 480  |
| Gln Leu Lys Gly His Val Asn Pro Lys Ala Arg Ala Ile Ser Cys Leu |      |
| 145 150 155 160                                                 |      |
| aag ggt cta gat gtc acc ccc cag ggt gtt tac ctg ctc tcc gac gtt | 528  |
| Lys Gly Leu Asp Val Thr Pro Gln Gly Val Tyr Leu Leu Ser Asp Val |      |
| 165 170 175                                                     |      |
| atc gag aac gag acc ggt ctc cac tgc ggt gtt ctg tcc ggg gct aac | 576  |
| Ile Glu Asn Glu Thr Gly Leu His Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn |      |
| 180 185 190                                                     |      |
| ctc gcc acc gag atc gct ctg gag aag tac tcc gag act acc gtt gct | 624  |
| Leu Ala Thr Glu Ile Ala Leu Glu Lys Tyr Ser Glu Thr Thr Val Ala |      |
| 195 200 205                                                     |      |
| tac aac cga ccc aag gac ttc ttt ggc gag ggt gat gtg acc aac gat | 672  |
| Tyr Asn Arg Pro Lys Asp Phe Phe Gly Glu Gly Asp Val Thr Asn Asp |      |
| 210 215 220                                                     |      |
| gtg ctc aag gct ctg ttc cac cga ccc tac ttc cat gtg cga tgc gtt | 720  |
| Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val Arg Cys Val |      |
| 225 230 235 240                                                 |      |
| cag gac gtc gcc ggt gtc tcc atc gga ggt gcc ctt aag aac gtt gtt | 768  |
| Gln Asp Val Ala Gly Val Ser Ile Gly Gly Ala Leu Lys Asn Val Val |      |
| 245 250 255                                                     |      |
| gcc ctt tgc gcc ggt ttc gtc gag ggc aag aac tgg gga gac aac gcc | 816  |
| Ala Leu Cys Ala Gly Phe Val Glu Gly Lys Asn Trp Gly Asp Asn Ala |      |
| 260 265 270                                                     |      |
| aag gcc gca att atg cga cga ggc atg ctt gag atg atc aac ttc tcc | 864  |
| Lys Ala Ala Ile Met Arg Arg Gly Met Leu Glu Met Ile Asn Phe Ser |      |
| 275 280 285                                                     |      |
| aag cga ttc ttc ccc gaa act gat att aac act ctt aca gtc gag tct | 912  |
| Lys Arg Phe Phe Pro Glu Thr Asp Ile Asn Thr Leu Thr Val Glu Ser |      |
| 290 295 300                                                     |      |
| gcc ggt gtg gcc gat ctc atc acc tcg tgc gct gga ggc cga aac ttc | 960  |
| Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Ser Cys Ala Gly Gly Arg Asn Phe |      |
| 305 310 315 320                                                 |      |
| aag gtc ggc cga gca ttc gga aag gag agc ggc tcc ggc aag acc atc | 1008 |
| Lys Val Gly Arg Ala Phe Gly Lys Glu Ser Gly Ser Gly Lys Thr Ile |      |
| 325 330 335                                                     |      |
| cag gac gtg gag aag gag ctt ctc aac ggc cag tcc gcc cag ggc gtc | 1056 |
| Gln Asp Val Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln Ser Ala Gln Gly Val |      |
| 340 345 350                                                     |      |
| atc aca tgt aac gag gtc cac gag ctg ctc aag aac aag aac atg cag | 1104 |
| Ile Thr Cys Asn Glu Val His Glu Leu Leu Lys Asn Lys Asn Met Gln |      |
| 355 360 365                                                     |      |
| aag gac ttc cct ctg ttc gag tcc acc tgg ggc att atc cac ggt gag | 1152 |
| Lys Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ser Thr Trp Gly Ile Ile His Gly Glu |      |
| 370 375 380                                                     |      |
| ctc aag att gat gat ctc ccc gag att ctt tac cac gcc aac tag     | 1197 |
| Leu Lys Ile Asp Asp Leu Pro Glu Ile Leu Tyr His Ala Asn         |      |
| 385 390 395                                                     |      |

<210> 11  
 <211> 398  
 <212> PRT  
 <213> *Yarrowia lipolytica*

<400> 11  
 Met Ser Ala Leu Leu Arg Ser Ser Leu Arg Phe Lys His Met Ser Ala  
     1                    5                    10                    15  
 Val Asn Arg Leu Thr Gln Gln Leu Arg Leu Leu Thr Ala Ser Ala Pro  
                     20                    25                    30  
 Leu Ser Ala Ala Asn Thr Ala Gly Lys Ala Pro Phe Lys Val Ala Val  
                     35                    40                    45  
 Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Val Ala Lys Ile Val Ala Glu  
                     50                    55                    60  
 Asn Cys Thr Ala His Pro Glu Leu Phe Glu Pro Glu Val Arg Val Trp  
                     65                    70                    75                    80  
 Val Arg Glu Glu Lys Val Asn Gly Lys Asn Leu Thr Asp Ile Phe Asn  
                     85                    90                    95  
 Ala Glu His Glu Asn Val Arg Tyr Leu Pro Lys Ile Lys Leu Pro His  
                     100                    105                    110  
 Asn Leu Ile Ala Glu Pro Asp Leu Leu Lys Ala Val Glu Gly Ala Asn  
                     115                    120                    125  
 Ile Ile Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe Leu Ala Gly Val Cys Lys  
                     130                    135                    140  
 Gln Leu Lys Gly His Val Asn Pro Lys Ala Arg Ala Ile Ser Cys Leu  
                     145                    150                    155                    160  
 Lys Gly Leu Asp Val Thr Pro Gln Gly Val Tyr Leu Leu Ser Asp Val  
                     165                    170                    175  
 Ile Glu Asn Glu Thr Gly Leu His Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn  
                     180                    185                    190  
 Leu Ala Thr Glu Ile Ala Leu Glu Lys Tyr Ser Glu Thr Thr Val Ala  
                     195                    200                    205  
 Tyr Asn Arg Pro Lys Asp Phe Phe Gly Glu Gly Asp Val Thr Asn Asp  
                     210                    215                    220  
 Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val Arg Cys Val  
                     225                    230                    235                    240  
 Gln Asp Val Ala Gly Val Ser Ile Gly Gly Ala Leu Lys Asn Val Val  
                     245                    250                    255  
 Ala Leu Cys Ala Gly Phe Val Glu Gly Lys Asn Trp Gly Asp Asn Ala  
                     260                    265                    270  
 Lys Ala Ala Ile Met Arg Arg Gly Met Leu Glu Met Ile Asn Phe Ser  
                     275                    280                    285  
 Lys Arg Phe Phe Pro Glu Thr Asp Ile Asn Thr Leu Thr Val Glu Ser  
                     290                    295                    300  
 Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Ser Cys Ala Gly Gly Arg Asn Phe  
                     305                    310                    315                    320  
 Lys Val Gly Arg Ala Phe Gly Lys Glu Ser Gly Ser Gly Lys Thr Ile  
                     325                    330                    335  
 Gln Asp Val Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln Ser Ala Gln Gly Val  
                     340                    345                    350  
 Ile Thr Cys Asn Glu Val His Glu Leu Leu Lys Asn Lys Asn Met Gln  
                     355                    360                    365  
 Lys Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ser Thr Trp Gly Ile Ile His Gly Glu  
                     370                    375                    380  
 Leu Lys Ile Asp Asp Leu Pro Glu Ile Leu Tyr His Ala Asn  
                     385                    390                    395

<210> 12  
 <211> 385  
 <212> PRT  
 <213> *Yarrowia lipolytica*

<400> 12  
 Met Ser Ala Val Asn Arg Leu Thr Gln Gln Leu Arg Leu Leu Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Pro Leu Ser Ala Ala Asn Thr Ala Gly Lys Ala Pro Phe Lys  
 20 25 30  
 Val Ala Val Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Val Ala Lys Ile  
 35 40 45  
 Val Ala Glu Asn Cys Thr Ala His Pro Glu Leu Phe Glu Pro Glu Val  
 50 55 60  
 Arg Val Trp Val Arg Glu Glu Lys Val Asn Gly Lys Asn Leu Thr Asp  
 65 70 75 80  
 Ile Phe Asn Ala Glu His Glu Asn Val Arg Tyr Leu Pro Lys Ile Lys  
 85 90 95  
 Leu Pro His Asn Leu Ile Ala Glu Pro Asp Leu Leu Lys Ala Val Glu  
 100 105 110  
 Gly Ala Asn Ile Ile Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe Leu Ala Gly  
 115 120 125  
 Val Cys Lys Gln Leu Lys Gly His Val Asn Pro Lys Ala Arg Ala Ile  
 130 135 140  
 Ser Cys Leu Lys Gly Leu Asp Val Thr Pro Gln Gly Val Tyr Leu Leu  
 145 150 155 160  
 Ser Asp Val Ile Glu Asn Glu Thr Gly Leu His Cys Gly Val Leu Ser  
 165 170 175  
 Gly Ala Asn Leu Ala Thr Glu Ile Ala Leu Glu Lys Tyr Ser Glu Thr  
 180 185 190  
 Thr Val Ala Tyr Asn Arg Pro Lys Asp Phe Phe Gly Glu Gly Asp Val  
 195 200 205  
 Thr Asn Asp Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val  
 210 215 220  
 Arg Cys Val Gln Asp Val Ala Gly Val Ser Ile Gly Gly Ala Leu Lys  
 225 230 235 240  
 Asn Val Val Ala Leu Cys Ala Gly Phe Val Glu Gly Lys Asn Trp Gly  
 245 250 255  
 Asp Asn Ala Lys Ala Ala Ile Met Arg Arg Gly Met Leu Glu Met Ile  
 260 265 270  
 Asn Phe Ser Lys Arg Phe Phe Pro Glu Thr Asp Ile Asn Thr Leu Thr  
 275 280 285  
 Val Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Ser Cys Ala Gly Gly  
 290 295 300  
 Arg Asn Phe Lys Val Gly Arg Ala Phe Gly Lys Glu Ser Gly Ser Gly  
 305 310 315 320  
 Lys Thr Ile Gln Asp Val Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln Ser Ala  
 325 330 335  
 Gln Gly Val Ile Thr Cys Asn Glu Val His Glu Leu Leu Lys Asn Lys  
 340 345 350  
 Asn Met Gln Lys Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ser Thr Trp Gly Ile Ile  
 355 360 365  
 His Gly Glu Leu Lys Ile Asp Asp Leu Pro Glu Ile Leu Tyr His Ala  
 370 375 380  
 Asn  
 385

<210> 13  
 <211> 1206  
 <212> DNA  
 <213> Zygosaccharomyces rouxii  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1203)  
 <223> coding for G3PDH  
 <400> 13  
 atg gcc gct act gac aga tta aac caa acc tct gat atc cta tcg caa 48  
 Met Ala Ala Thr Asp Arg Leu Asn Gln Thr Ser Asp Ile Leu Ser Gln  
 1 5 10 15  
 tct atg aag aag acc gac tca tca atg tca gtc gtt acc gct gag aat 96  
 Ser Met Lys Lys Thr Asp Ser Ser Met Ser Val Val Thr Ala Glu Asn  
 20 25 30  
 cca tac aaa gtt tcc gtc gtc ggc tct ggt aac tgg ggt acc acc atc 144  
 Pro Tyr Lys Val Ser Val Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile  
 35 40 45  
 gcc aag gtc gtt gcc gaa aac acc aag gaa aag cca gaa ttg ttc caa 192  
 Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Thr Lys Glu Lys Pro Glu Leu Phe Gln  
 50 55 60  
 gaa cgt gtg gac atg tgg gtg ttt gaa gaa cag atc gac ggt act cca 240  
 Glu Arg Val Asp Met Trp Val Phe Glu Glu Gln Ile Asp Gly Thr Pro  
 65 70 75 80  
 ttg gcc caa atc atc aac acc aag cac cag aac gtg aaa tac ttg cca 288  
 Leu Ala Gln Ile Ile Asn Thr Lys His Gln Asn Val Lys Tyr Leu Pro  
 85 90 95  
 aac atc gac ctt ccg gac aat ttg gtc gct aac cca gac ttg att gcc 336  
 Asn Ile Asp Leu Pro Asp Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile Ala  
 100 105 110  
 acc acg aag gac gcc gat gtg att gtt ttc aac gtt ccc cat caa ttt 384  
 Thr Thr Lys Asp Ala Asp Val Ile Val Phe Asn Val Pro His Gln Phe  
 115 120 125  
 ttg ggc cgt atc gtt gct caa atg aag ggt caa atc aaa cca act gca 432  
 Leu Gly Arg Ile Val Ala Gln Met Lys Gly Gln Ile Lys Pro Thr Ala  
 130 135 140  
 cgt gcg gtc tcc tgt cta aag ggt ttc gaa gtt ggt cca aag ggt gtg 480  
 Arg Ala Val Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Pro Lys Gly Val  
 145 150 155 160  
 cag ctt cta tct gac tac gtc act caa gaa ttg ggt atc gaa tgt ggt 528  
 Gln Leu Leu Ser Asp Tyr Val Thr Gln Glu Leu Gly Ile Glu Cys Gly  
 165 170 175  
 gct cta tct ggt gct aac ttg gcc cca gaa gtc gcc aag gaa cac tgg 576  
 Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu His Trp  
 180 185 190  
 tcc gag acc acc gtc gct tac cac atc cca gac gac ttc aag ggt gac 624  
 Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr His Ile Pro Asp Asp Phe Lys Gly Asp  
 195 200 205  
 ggt aag gac atc gac cac cgt gtc ttg aag cag ttg ttc cac aga cca 672  
 Gly Lys Asp Ile Asp His Arg Val Leu Lys Gln Leu Phe His Arg Pro  
 210 215 220

## 18

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| tac ttc cac gtg aat gtg att gac gat gtt gct ggt atc tcc atc gca | 720  |
| Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile Ala |      |
| 225 230 235 240                                                 |      |
| ggt gca ttg aag aac gtg gtc gcc ttg ggt tgc ggt ttc gtt acc ggt | 768  |
| Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Thr Gly |      |
| 245 250 255                                                     |      |
| cta ggt tgg ggt aac aac gcc gcc gcc gcc atc caa cgt gtc ggt ttg | 816  |
| Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ala Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly Leu |      |
| 260 265 270                                                     |      |
| ggt gaa atc atc aag ttc ggt agg atg ttc ttc cca gaa tcc aag gtg | 864  |
| Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser Lys Val |      |
| 275 280 285                                                     |      |
| gag act tac tac caa gaa tcc gca ggt gtt gct gac ttg atc acc acc | 912  |
| Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr |      |
| 290 295 300                                                     |      |
| tgt tcc ggt ggt aga aac gtc cgt gtt gcc acc gaa atg gcc aag act | 960  |
| Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Arg Val Ala Thr Glu Met Ala Lys Thr |      |
| 305 310 315 320                                                 |      |
| ggt aag agc ggt gag caa gtc gaa aaa gac atc ttg aac ggt caa tcc | 1008 |
| Gly Lys Ser Gly Glu Gln Val Glu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Gln Ser |      |
| 325 330 335                                                     |      |
| gct caa ggt ttg gtc acc tgt aag gaa gtt cac cag tgg tta gaa tct | 1056 |
| Ala Gln Gly Leu Val Thr Cys Lys Glu Val His Gln Trp Leu Glu Ser |      |
| 340 345 350                                                     |      |
| agt gga aac acc gaa gac ttc cca ttg ttc gag gct gtc tac cag atc | 1104 |
| Ser Gly Asn Thr Glu Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln Ile |      |
| 355 360 365                                                     |      |
| act tac gaa aac gtg ccc atg aag gag ttg cca tct atg atc gaa gaa | 1152 |
| Thr Tyr Glu Asn Val Pro Met Lys Glu Leu Pro Ser Met Ile Glu Glu |      |
| 370 375 380                                                     |      |
| ttg gat atc gat agc aca tcg aag tgc gta ttg agt tac aag atg ggt | 1200 |
| Leu Asp Ile Asp Ser Thr Ser Lys Cys Val Leu Ser Tyr Lys Met Gly |      |
| 385 390 395 400                                                 |      |
| ctc tag                                                         | 1206 |
| Leu                                                             |      |
| <210> 14                                                        |      |
| <211> 401                                                       |      |
| <212> PRT                                                       |      |
| <213> Zygosaccharomyces rouxii                                  |      |
| <400> 14                                                        |      |
| Met Ala Ala Thr Asp Arg Leu Asn Gln Thr Ser Asp Ile Leu Ser Gln |      |
| 1 5 10 15                                                       |      |
| Ser Met Lys Lys Thr Asp Ser Ser Met Ser Val Val Thr Ala Glu Asn |      |
| 20 25 30                                                        |      |
| Pro Tyr Lys Val Ser Val Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile |      |
| 35 40 45                                                        |      |
| Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Thr Lys Glu Lys Pro Glu Leu Phe Gln |      |
| 50 55 60                                                        |      |
| Glu Arg Val Asp Met Trp Val Phe Glu Glu Gln Ile Asp Gly Thr Pro |      |
| 65 70 75 80                                                     |      |

## 19

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Leu | Ala | Gln | Ile | Ile | Asn | Thr | Lys | His | Gln | Asn | Val | Lys | Tyr | Leu | Pro |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| Asn | Ile | Asp | Leu | Pro | Asp | Asn | Leu | Val | Ala | Asn | Pro | Asp | Leu | Ile | Ala |  |
|     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |  |
| Thr | Thr | Lys | Asp | Ala | Asp | Val | Ile | Val | Phe | Asn | Val | Pro | His | Gln | Phe |  |
|     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |  |
| Leu | Gly | Arg | Ile | Val | Ala | Gln | Met | Lys | Gly | Gln | Ile | Lys | Pro | Thr | Ala |  |
|     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |  |
| Arg | Ala | Val | Ser | Cys | Leu | Lys | Gly | Phe | Glu | Val | Gly | Pro | Lys | Gly | Val |  |
|     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |  |
| Gln | Leu | Leu | Ser | Asp | Tyr | Val | Thr | Gln | Glu | Leu | Gly | Ile | Glu | Cys | Gly |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Ala | Leu | Ser | Gly | Ala | Asn | Leu | Ala | Pro | Glu | Val | Ala | Lys | Glu | His | Trp |  |
|     |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |  |
| Ser | Glu | Thr | Thr | Val | Ala | Tyr | His | Ile | Pro | Asp | Asp | Phe | Lys | Gly | Asp |  |
|     |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |  |
| Gly | Lys | Asp | Ile | Asp | His | Arg | Val | Leu | Lys | Gln | Leu | Phe | His | Arg | Pro |  |
|     |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |  |
| Tyr | Phe | His | Val | Asn | Val | Ile | Asp | Asp | Val | Ala | Gly | Ile | Ser | Ile | Ala |  |
|     |     |     |     | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |  |
| Gly | Ala | Leu | Lys | Asn | Val | Val | Ala | Leu | Gly | Cys | Gly | Phe | Val | Thr | Gly |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| Leu | Gly | Trp | Gly | Asn | Asn | Ala | Ala | Ala | Ala | Ile | Gln | Arg | Val | Gly | Leu |  |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |  |
| Gly | Glu | Ile | Ile | Lys | Phe | Gly | Arg | Met | Phe | Phe | Pro | Glu | Ser | Lys | Val |  |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |  |
| Glu | Thr | Tyr | Tyr | Gln | Glu | Ser | Ala | Gly | Val | Ala | Asp | Leu | Ile | Thr | Thr |  |
|     |     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |  |
| Cys | Ser | Gly | Gly | Arg | Asn | Val | Arg | Val | Ala | Thr | Glu | Met | Ala | Lys | Thr |  |
|     |     |     |     | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |  |
| Gly | Lys | Ser | Gly | Glu | Gln | Val | Glu | Lys | Asp | Ile | Leu | Asn | Gly | Gln | Ser |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |  |
| Ala | Gln | Gly | Leu | Val | Thr | Cys | Lys | Glu | Val | His | Gln | Trp | Leu | Glu | Ser |  |
|     |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |  |
| Ser | Gly | Asn | Thr | Glu | Asp | Phe | Pro | Leu | Phe | Glu | Ala | Val | Tyr | Gln | Ile |  |
|     |     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |  |
| Thr | Tyr | Glu | Asn | Val | Pro | Met | Lys | Glu | Leu | Pro | Ser | Met | Ile | Glu | Glu |  |
|     |     |     |     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |  |
| Leu | Asp | Ile | Asp | Ser | Thr | Ser | Lys | Cys | Val | Leu | Ser | Tyr | Lys | Met | Gly |  |
|     |     |     |     | 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |  |
|     |     |     |     | 400 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Leu |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

```
<210> 15
<211> 1170
<212> DNA
<213> Zygosaccharomyces rouxii
```

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1167)

&lt;223&gt; coding for G3PDH

&lt;400&gt; 15

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| atg gcc gcc act gac aga tta aac caa acc tcc gat atc cta tct cat | 48  |
| Met Ala Ala Thr Asp Arg Leu Asn Gln Thr Ser Asp Ile Leu Ser His |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| tct atg aag aag act gat acc tca atg tca att gtt acc gct gag aat | 96  |
| Ser Met Lys Lys Thr Asp Thr Ser Met Ser Ile Val Thr Ala Glu Asn |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| cct tac aag gtc gct gtt gtc ggt tct ggt aac tgg ggt acc act atc | 144 |
| Pro Tyr Lys Val Ala Val Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| gct aag gtt gtt gcc gaa aac acc aaa gaa aag cca gag ttg ttc caa | 192 |
| Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Thr Lys Glu Lys Pro Glu Leu Phe Gln |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| gga cgt gtg gac atg tgg gtt ttc gaa gaa caa atc gat ggt act cca | 240 |
| Gly Arg Val Asp Met Trp Val Phe Glu Glu Gln Ile Asp Gly Thr Pro |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| ttg act caa atc atc aac acc aaa cac caa aac gtc aaa tac ctt cca | 288 |
| Leu Thr Gln Ile Ile Asn Thr Lys His Gln Asn Val Lys Tyr Leu Pro |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| aac atc gat ctt ccg ggg aat ttg gtc gct aac cca gat ttg atc tct | 336 |
| Asn Ile Asp Leu Pro Gly Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile Ser |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| act acc aag gac gct gat gtc atc gtt ttc aac gtt cct cac caa ttt | 384 |
| Thr Thr Lys Asp Ala Asp Val Ile Val Phe Asn Val Pro His Gln Phe |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| ttg ggc cgt atc gtt tct caa atg aag ggt caa atc aaa cca gat gct | 432 |
| Leu Gly Arg Ile Val Ser Gln Met Lys Gly Gln Ile Lys Pro Asp Ala |     |
| 130 135 140                                                     |     |
| cgt gcc atc tcc tgt cta aag ggt ttc gaa gtt ggt cca aag ggt gtc | 480 |
| Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Pro Lys Gly Val |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |
| caa cta ctt tct gac tac gtc act caa gaa tta ggt atc caa tgt ggt | 528 |
| Gln Leu Leu Ser Asp Tyr Val Thr Gln Glu Leu Gly Ile Gln Cys Gly |     |
| 165 170 175                                                     |     |
| gcc cta tct ggt gct aac ttg gct cca gaa gtc gcc aag gaa cac tgg | 576 |
| Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu His Trp |     |
| 180 185 190                                                     |     |
| tcc gaa act acc gtc gct tac caa gtc cca gat gac ttc aag ggt gaa | 624 |
| Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Val Pro Asp Asp Phe Lys Gly Glu |     |
| 195 200 205                                                     |     |
| ggt aaa gat atc gac cac cgt gtc ttg aaa caa ttg ttc cac aga cca | 672 |
| Gly Lys Asp Ile Asp His Arg Val Leu Lys Gln Leu Phe His Arg Pro |     |
| 210 215 220                                                     |     |
| tac ttc cac gtc aat gtg atc gac gat gtt gct ggt att tct atc gca | 720 |
| Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile Ala |     |
| 225 230 235 240                                                 |     |
| ggt gca ttg aag aac gtg gtt gcc ttg ggt tgc ggt ttc gtc acc ggt | 768 |
| Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Thr Gly |     |
| 245 250 255                                                     |     |

## 21

cta ggc tgg ggt aac aac gct gcc gcc gcc atc caa cgt gtt ggt ttg 816  
 Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly Leu  
 260 265 270

ggt gaa atc atc aag ttc ggt aga atg ttc ttc cca gaa tcc aag gtg 864  
 Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser Lys Val  
 275 280 285

gaa act tac tac caa gaa tct gca ggt gtt gct gat ttg atc act acc 912  
 Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr  
 290 295 300

tgt tcc ggt ggt aga aac gtt cgt gtc gcc act gaa atg gcc aag act 960  
 Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Arg Val Ala Thr Glu Met Ala Lys Thr  
 305 310 315 320

ggt aag agc ggt gaa caa gtc gaa aag gac atc ttg aac ggt caa tcc 1008  
 Gly Lys Ser Gly Glu Gln Val Glu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Gln Ser  
 325 330 335

gct caa ggt ttg att act gct aag gaa gtc cac caa tgg ttg gaa tcc 1056  
 Ala Gln Gly Leu Ile Thr Ala Lys Glu Val His Gln Trp Leu Glu Ser  
 340 345 350

agc ggt cac acc gaa gaa tac cca ttg ttt gaa gcc gtc tac caa atc 1104  
 Ser Gly His Thr Glu Glu Tyr Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln Ile  
 355 360 365

act tac gaa aac gtg ccc atg aag gag ttg cca tcc atg atc gaa gaa 1152  
 Thr Tyr Glu Asn Val Pro Met Lys Glu Leu Pro Ser Met Ile Glu Glu  
 370 375 380

ttg gat atc gta gaa taa 1170  
 Leu Asp Ile Val Glu  
 385

<210> 16  
 <211> 389  
 <212> PRT  
 <213> *Zygosaccharomyces rouxii*  
 <400> 16

Met Ala Ala Thr Asp Arg Leu Asn Gln Thr Ser Asp Ile Leu Ser His  
 1 5 10 15

Ser Met Lys Lys Thr Asp Thr Ser Met Ser Ile Val Thr Ala Glu Asn  
 20 25 30

Pro Tyr Lys Val Ala Val Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile  
 35 40 45

Ala Lys Val Val Ala Glu Asn Thr Lys Glu Lys Pro Glu Leu Phe Gln  
 50 55 60

Gly Arg Val Asp Met Trp Val Phe Glu Glu Gln Ile Asp Gly Thr Pro  
 65 70 75 80

Leu Thr Gln Ile Ile Asn Thr Lys His Gln Asn Val Lys Tyr Leu Pro  
 85 90 95

Asn Ile Asp Leu Pro Gly Asn Leu Val Ala Asn Pro Asp Leu Ile Ser  
 100 105 110

Thr Thr Lys Asp Ala Asp Val Ile Val Phe Asn Val Pro His Gln Phe  
 115 120 125

Leu Gly Arg Ile Val Ser Gln Met Lys Gly Gln Ile Lys Pro Asp Ala  
 130 135 140

## 22

Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu Val Gly Pro Lys Gly Val  
 145 150 155 160  
 Gln Leu Leu Ser Asp Tyr Val Thr Gln Glu Leu Gly Ile Gln Cys Gly  
 165 170 175  
 Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala Lys Glu His Trp  
 180 185 190  
 Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Gln Val Pro Asp Asp Phe Lys Gly Glu  
 195 200 205  
 Gly Lys Asp Ile Asp His Arg Val Leu Lys Gln Leu Phe His Arg Pro  
 210 215 220  
 Tyr Phe His Val Asn Val Ile Asp Asp Val Ala Gly Ile Ser Ile Ala  
 225 230 235 240  
 Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Gly Cys Gly Phe Val Thr Gly  
 245 250 255  
 Leu Gly Trp Gly Asn Asn Ala Ala Ala Ile Gln Arg Val Gly Leu  
 260 265 270  
 Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly Arg Met Phe Phe Pro Glu Ser Lys Val  
 275 280 285  
 Glu Thr Tyr Tyr Gln Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr  
 290 295 300  
 Cys Ser Gly Gly Arg Asn Val Arg Val Ala Thr Glu Met Ala Lys Thr  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Ser Gly Glu Gln Val Glu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Gln Ser  
 325 330 335  
 Ala Gln Gly Leu Ile Thr Ala Lys Glu Val His Gln Trp Leu Glu Ser  
 340 345 350  
 Ser Gly His Thr Glu Glu Tyr Pro Leu Phe Glu Ala Val Tyr Gln Ile  
 355 360 365  
 Thr Tyr Glu Asn Val Pro Met Lys Glu Leu Pro Ser Met Ile Glu Glu  
 370 375 380  
 Leu Asp Ile Val Glu  
 385

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 8809

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: expression  
 vector pSUN-USP containing Saccharomyces G3PDH

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1017)..(2189)

&lt;223&gt; coding for G3PDH

&lt;400&gt; 17

 aatattcaaa caaacacata cagcgcgact tatcatggac atacaaatgg acgaacggat 60  
 aaaccttttc acgccctttt aaatatccga ttattctaataa aaacgctctt ttctcttagg 120  
 tttaaccgcc aatatatcct gtcaaact gatagtttaa actgaaggcg ggaaacgaca 180

|             |             |             |             |             |            |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| atcagatcta  | gtaggaaaca  | gctatgacca  | tgattacgcc  | aagcttgcat  | gcctgcaggt | 240  |
| cgactctaga  | ctagtggatc  | cgatatcgcc  | cgggctcgag  | gtaccgagct  | cgaattcggc | 300  |
| gcgccgagct  | cctcgagcaa  | atctacacat  | tgccactaaa  | cgtctaaacc  | cttgtaattt | 360  |
| gtttttgttt  | tactatgtgt  | gttatgtatt  | tgatttgcca  | taaattttta  | tatttggtac | 420  |
| taaattttata | acacctttta  | tgctaacgtt  | tgccaacact  | tagcaatttg  | caagttgatt | 480  |
| aattgattct  | aaattatttt  | tgtcttctaa  | atacatatac  | taatcaactg  | gaaatgtaaa | 540  |
| tatttgctaa  | tatttctact  | ataggagaat  | taaagtgagt  | gaatatggta  | ccacaagggt | 600  |
| tggagattta  | attgttgcaa  | tgatgcatgg  | atggcatata  | caccaaaccat | tcaataattc | 660  |
| ttgaggataa  | taatggtacc  | acacaagatt  | tgaggtgcat  | gaacgtcacg  | tggacaaaag | 720  |
| gttttagtaat | ttttcaagac  | aacaatgtta  | ccacacacaa  | gttttgaggt  | gcatgcatgg | 780  |
| atgccctgtg  | gaaagtttaa  | aaatatTTTT  | gaaatgattt  | gcatggaagc  | catgtgtaaa | 840  |
| accatgacat  | ccacttggag  | gatgcaataa  | tgaagaaaac  | tacaaattta  | catgcaacta | 900  |
| gttatgcatg  | tagtctatat  | aatgaggatt  | ttgcaatact  | ttcattcata  | cacactcact | 960  |
| aagttttaca  | cgattataat  | ttcttcatag  | ccagcccacc  | gcgggtggcg  | gccgccatgt | 1020 |
| ctgctgctgc  | tgatagatta  | aacttaactt  | ccggccactt  | gaatgctggt  | agaaagagaa | 1080 |
| gttctctctc  | tgtttctttg  | aaggctgccg  | aaaagccttt  | caaggttact  | gtgattggat | 1140 |
| ctggtaactg  | gggtactact  | attgccaaagg | tggttgccga  | aaattgtaag  | ggatacccag | 1200 |
| aagttttcgc  | tccaatagta  | caaatgtggg  | tgttcgaaga  | agagatcaat  | ggtgaaaaat | 1260 |
| tgactgaaat  | cataaatact  | agacatcaaa  | acgtgaaata  | cttgccctggc | atcactctac | 1320 |
| ccgacaattt  | ggttgctaatt | ccagacttga  | ttgattcagt  | caaggatgtc  | gacatcatcg | 1380 |
| tcttcaacat  | tccacatcaa  | tttttgcccc  | gtatctgtag  | ccaattgaaa  | ggtcatgttg | 1440 |
| attcacacgt  | cagagctatc  | tccctgtctaa | aggggttttga | agttggtgct  | aaagggtgtc | 1500 |
| aattgctatc  | ctcttacatc  | actgaggaac  | taggtattca  | atgtggtgct  | ctatctggtg | 1560 |
| ctaacattgc  | cactgaagtc  | gctcaagaac  | actggtctga  | aacaacagtt  | gcttaccaca | 1620 |
| ttccaaagga  | tttcagaggc  | gagggcaagg  | acgtcgacca  | taagggttcta | aaggccttgt | 1680 |
| tccacagacc  | ttactttcac  | gttagtgtca  | tcgaagatgt  | tgctggtatc  | tccatctgtg | 1740 |
| gtgctttgaa  | gaacgtttgt  | gccttagggt  | gtggtttcgt  | cgaagggtcta | ggctggggta | 1800 |
| acaacgcttc  | tgctgccatc  | caaagagtcg  | gtttgggtga  | gatcatcaga  | ttcgggtcaa | 1860 |
| tgtttttccc  | agaatctaga  | gaagaaacat  | actaccaaga  | gtctgctggg  | gttgctgatt | 1920 |
| tgatcaccac  | ctgcgctggg  | ggtagaaaacg | tcaagggttc  | taggctaattg | gctacttctg | 1980 |
| gtaaggacgc  | ctgggaatgt  | gaaaaggagt  | tgttgaatgg  | ccaatccgct  | caaggtttaa | 2040 |
| ttacctgcaa  | agaagttcac  | gaatggttgg  | aaacatgtgg  | ctctgtcgaa  | gacttcccat | 2100 |
| tatttgaaagc | cgtataccaa  | atcgttttaca | acaactaccc  | aatgaagaac  | ctgccggaca | 2160 |
| tgattgaaga  | attagatcta  | catgaagatt  | aggcggccgc  | ctgcagtcta  | gaaggcctcc | 2220 |
| tgctttaatg  | agatatgcga  | gacgcctatg  | atcgcatgat  | atctgctttc  | aattctgttg | 2280 |
| tgcacgttgt  | aaaaaacctg  | agcatgtgta  | gctcagatcc  | ttaccgccgg  | tttcggttca | 2340 |
| ttctaataaa  | tatatcacc   | gttactatcg  | tatttttatg  | aataatattc  | tccgttcaat | 2400 |
| ttactgattg  | tccgtcgacg  | aattcactgg  | ccgtcgtttt  | acaacgactc  | agagcttgac | 2460 |
| aggaggcccg  | atctagtaac  | atagatgaca  | ccgcgcgcga  | taatttatcc  | tagtttgccg | 2520 |
| gctataattt  | gttttctatc  | gcgtattaaa  | tgtataattg  | cgggactcta  | atcataaaaa | 2580 |
| cccattctcat | aaataacgtc  | atgcattaca  | tgttaattat  | tacatgctta  | acgtaattca | 2640 |
| acagaaatta  | tatgataatc  | atcgcaagac  | cggcaacagg  | attcaatctt  | aagaaacttt | 2700 |
| attgccaaat  | gtttgaacga  | tcggggatca  | tccgggtctg  | tggcggggaa  | tccacgaaaa | 2760 |
| tatccgaacg  | cagcaagatc  | tagagcttgg  | gtcccgtcca  | gaagaactcg  | tcaagaaggc | 2820 |
| gatagaaggc  | gatgcgctgc  | gaatcgggag  | cggcgatacc  | gtaaagcacg  | aggaagcggg | 2880 |
| cagcccattc  | gccgccaaag  | tcttcagcaa  | tatcacgggt  | agccaacgct  | atgtcctgat | 2940 |
| agcgggtccg  | cacaccacag  | cggccacagt  | cgatgaatcc  | agaaaagcgg  | ccattttcca | 3000 |
| ccatgatatt  | cggcaagcag  | gcatcgccat  | gtgtcacgac  | gagatcctcg  | ccgtcgggca | 3060 |
| tgcgcgctct  | gagcctggcg  | aacagttcgg  | ctggcgcgag  | cccctgatgc  | tcttcgtcca | 3120 |
| gatcatcctg  | atcgacaaga  | ccggcttcca  | tccgagtacg  | tgctcgctcg  | atgcgatgtt | 3180 |
| tcgcttggtg  | gtcgaatggg  | caggtagccg  | gatcaagcgt  | atgcagccgc  | cgcattgcat | 3240 |
| cagccatgat  | ggatactttc  | tcggcaggag  | caagggtgaga | tgacaggaga  | tcctgccccg | 3300 |
| gcacttcgcc  | caatagcagc  | cagtcccttc  | ccgcttcagt  | gacaacgtcg  | agcacagctg | 3360 |
| cgcaaggaac  | gcccgctcgt  | gccagccacg  | atagccgcgc  | tgctcgtcc   | tgcagttcat | 3420 |
| tcagggcacc  | ggacaggtcg  | gtcttgacaa  | aaagaaccgg  | gcgcccctgc  | gctgacagcc | 3480 |
| ggaacacggc  | ggcatcagag  | cagccgattg  | tctgttgtgc  | ccagtcatag  | ccgaatagcc | 3540 |
| tctccaccca  | agcgggccgga | gaacctgcgt  | gcaatccatc  | ttgttcaatc  | atgcgaaacg | 3600 |

|             |            |             |             |             |             |      |
|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| atccagatcc  | ggtgcagatt | at ttggattg | agagtgaata  | tgagactcta  | attggatacc  | 3660 |
| gaggggaatt  | tatggaacgt | cagtggagca  | tttttgacaa  | gaaatatttg  | ctagctgata  | 3720 |
| gtgaccttag  | gcgacttttg | aacgcgcaat  | aatggtttct  | gacgtatgtg  | cttagctcat  | 3780 |
| taaactccag  | aaacccgcgg | ctgagtggtc  | ccttcaacgt  | tgcggttctg  | tcagttccaa  | 3840 |
| acgtaaaacg  | gcttgtcccg | cgatcatggc  | gggggtcata  | acgtgactcc  | cttaattctc  | 3900 |
| cgctcatgat  | cagattgtcg | tttcccgcc   | tcagttttaa  | ctatcagtg   | ttgacaggat  | 3960 |
| caacttttaga | taataattgt | cattagattg  | tttttatgca  | tagatgcact  | cgaaatcagc  | 4020 |
| caatttttaga | caagtatcaa | acggatgtta  | attcagtaca  | ttaaagacgt  | ccgcaatgtg  | 4080 |
| ttattaagtt  | gtctaagcgt | caatttgttt  | acaccacaat  | atatcctgcc  | accagccagc  | 4140 |
| caacagctcc  | ccgaccggca | gctcggcaca  | aatcaccac   | gcgtctaaaa  | aggtgatgtg  | 4200 |
| tatttgagta  | aaacagcttg | cgatcatg    | tcgctgcgta  | tatgatgcga  | tgagtaaata  | 4260 |
| aacaaatagc  | caaggggaac | gcatgaaggt  | tatcgctgta  | cttaaccaga  | aaggcgggtc  | 4320 |
| aggcaagacg  | accatcgcaa | cccatctagc  | ccgcgccttg  | caactcgccg  | gggcccgatgt | 4380 |
| tctgttagtc  | gattccgata | cccagggcag  | tgcccgcgat  | tgggcggccg  | tgccgggaaga | 4440 |
| tcaaccgcta  | accgttgtcg | gcatcgaccg  | cccgacgatt  | gaccgcgacg  | tgaaggccat  | 4500 |
| cggccggcgc  | gacttcgtag | tgatcgacgg  | agcgcgccag  | gcggcggact  | tggtgtgtgc  | 4560 |
| cgcatcaag   | gcagccgact | tcgtgctgat  | tccggtgcag  | ccaagccctt  | acgacatatg  | 4620 |
| ggccaccgcc  | gacctgggtg | agctgggtta  | gcagcgcatt  | gaggtcacgg  | atggaaggct  | 4680 |
| acaagcggcc  | tttgtcgtgt | cgccggcgat  | caaaggcacg  | cgcatcgccg  | gtgaggttgc  | 4740 |
| cgaggcgctg  | actgggtacg | agctgccc    | tcttgagtc   | cgtatcacgc  | agcgcgtgag  | 4800 |
| ctaccaggc   | gctccgcgcg | ccggcacaac  | cgcttctgaa  | tcagaaccgc  | agggcgacgc  | 4860 |
| tgcccgcgag  | gtccaggcgc | tgcccgctga  | aattaaatca  | aaactcattt  | gagttaatga  | 4920 |
| ggtaaagaga  | aaatgagcaa | aagcacaac   | acgctaagtg  | ccggccgtcc  | gagcgacgc   | 4980 |
| agcagcaagg  | ctgcaacgtt | ggccagcctg  | gcagacacgc  | cagccatgaa  | gcgggtcaac  | 5040 |
| tttcagttgc  | cggcgaggga | tcacaccaag  | ctgaagatgt  | acgcggtacg  | ccaaggcaag  | 5100 |
| accattaccg  | agctgctatc | tgaatacatc  | gcgcagctac  | cagagtaaat  | gagcaaatga  | 5160 |
| ataaatgagt  | agatgaattt | tagcggctaa  | aggaggcggc  | atggaaaatc  | aagaacaacc  | 5220 |
| aggcaccgac  | gccgtggaat | gccccatgtg  | tggaggaaacg | ggcggttggc  | caggcgtaag  | 5280 |
| cggctgggtt  | gtctgcgggc | cctgcaatgg  | cactggaacc  | cccaagcccg  | aggaatcggc  | 5340 |
| gtgagcggtc  | gcaaaccatc | cggcccggtg  | caaatcggcg  | cggcgctggg  | tgatgacctg  | 5400 |
| gtggagaagt  | tgaaggccgc | gcaggccgcc  | cagcggcaac  | gcacgaggc   | agaagacgcc  | 5460 |
| ccggtgaatc  | gtggcaaggg | gccgctgata  | gaatccgcaa  | agaatcccg   | caaccgcccg  | 5520 |
| cagccggtgc  | gccgtcgatt | aggaagccgc  | ccaagggcga  | cgagcaacca  | gatttttttcg | 5580 |
| ttccgatgct  | ctatgacgtg | ggcaccgcgc  | atagtcgcag  | catcatggac  | gtggccggtt  | 5640 |
| tccgtctgtc  | gaagcgtgac | cgacgagctg  | gcgaggtgat  | ccgctacgag  | cttcagacgc  | 5700 |
| ggcacgtaga  | ggtttccgca | gggcccggcg  | gcatggccag  | tgtgtgggat  | tacgacctgg  | 5760 |
| tactgatggc  | ggtttcccat | ctaaccgaat  | ccatgaaccg  | ataccgggaa  | gggaaggag   | 5820 |
| acaagcccg   | ccgctgttgc | cgctccacac  | ttgcggacgt  | actcaagttc  | tgccggcgag  | 5880 |
| ccgatggcgg  | aaagcagaaa | gacgacctgg  | tagaaacctg  | cattcgggtta | aacaccacgc  | 5940 |
| acgttgccat  | gcagcgtacg | aagaaggcca  | agaacggccg  | cctggtgacg  | gtatccgagg  | 6000 |
| gtgaagcctt  | gattagccgc | tacaagatcg  | taaagagcga  | aaccgggcgg  | ccggagtaca  | 6060 |
| tcgagatcga  | gctagctgat | tggatgtacc  | gcgagatcac  | agaaggcaag  | aaccggacgc  | 6120 |
| tgctgacggt  | tcaccccgat | tactttttga  | tcgatcccgc  | catcgccgt   | tttctctacc  | 6180 |
| gcctggcacg  | ccgcgcgcga | ggcaaggcag  | aagccagatg  | gttgttcaag  | acgatctacg  | 6240 |
| aacgcagtg   | cagcgccgga | gagttcaaga  | agttctgttt  | caccgtgcgc  | aagctgatcg  | 6300 |
| ggtcaaatga  | cctgccggag | tacgatttga  | aggaggaggc  | ggggcaggct  | ggcccgatcc  | 6360 |
| tagtcatg    | ctaccgcaac | ctgatcgagg  | gcgaagcatc  | cgccggttcc  | taatgtacgc  | 6420 |
| agcagatgct  | agggcaaat  | gccctagcag  | gggaaaaagg  | tcgaaaagg   | ctctttcctg  | 6480 |
| tggatagcac  | gtacattggg | aaccctaaagc | cgtacattgg  | gaaccggaac  | ccgtacattg  | 6540 |
| ggaaccctaaa | gccgtacatt | gggaaccggt  | cacacatgta  | agtgactgat  | ataaaagaga  | 6600 |
| aaaaaggcga  | tttttccgcc | taaaactctt  | taaaacttat  | taaaactctt  | aaaaccgcgc  | 6660 |
| tggcctgtgc  | ataactgtct | ggccagcgca  | cagccgaaga  | gctgcaaaaa  | gcgcctaccc  | 6720 |
| ttcggtcgct  | gcgctcccta | cgccccgcgc  | cttcgcgtcg  | gcctatcgcg  | gcctatgcgg  | 6780 |
| tgtgaaatag  | cgcacagatg | cgtaaggaga  | aaataccgca  | tcaggcgctc  | ttccgcttcc  | 6840 |
| tcgctcactg  | actcgctgcg | ctcggtcggt  | cggctgcggc  | gagcgggtatc | agctcactca  | 6900 |
| aaggcggtaa  | tacggttatc | cacagaatca  | ggggataacg  | caggaaagaa  | catgtgagca  | 6960 |
| aaaggccagc  | aaaaggccag | gaaccgtaaa  | aaggccgcgt  | tgctggcggt  | tttccatagg  | 7020 |

```

ctccgcccc  ctgacgagca  tcacaaaaat  cgacgctcaa  gtcagagggtg  gcgaaacccg  7080
acaggactat  aaagatacca  ggcgtttccc  cctggaagct  cctcgtgcg  ctctcctgtt  7140
ccgaccctgc  cgcttaccgg  atacctgtcc  gcctttctcc  cttcggaag  cgtggcgctt  7200
tctcatagct  cacgctgtag  gtatctcagt  tcggtgtagg  tcgttcgctc  caagctgggc  7260
tgtgtgcacg  aaccccccg  tcagcccgac  cgctgcgcct  tatccggtaa  ctatcgtctt  7320
gagtccaacc  cggttaagaca  cgacttatcg  ccactggcag  cagccactgg  taacaggatt  7380
agcagagcga  ggtatgtagg  cgggtgctaca  gagttcttga  agtgggtggc  taactacggc  7440
tacactagaa  ggacagtatt  tggatatctgc  gctctgctga  agccagttac  cttcggaaaa  7500
agagttggta  gctcttgatc  cggcaaacaa  accaccgctg  gtagcgggtg  tttttttgtt  7560
tgcaagcagc  agattacgcg  cagaaaaaaa  ggatctcaag  aagatccttt  gatcttttct  7620
acggggctctg  acgctcagtg  gaacgaaaac  tcacgttaag  ggattttggt  catgcatgat  7680
atatctccca  atttgtgtag  ggcttattat  gcacgcttaa  aaataataaa  agcagacttg  7740
acctgatagt  ttggctgtga  gcaattatgt  gcttagtgca  tctaacgctt  gagttaagcc  7800
gcgcgcgaa  gcggcgtcgg  cttgaacgaa  tttctagcta  gacattattt  gccgactacc  7860
ttggtgatct  cgcccttcac  gtagtggaca  aattcttcca  actgatctgc  gcgcgaggcc  7920
aagcgatctt  cttcttgctc  aagataagcc  tgtctagctt  caagtatgac  gggctgatac  7980
tgggccggca  ggcgctccat  tgcccagtcg  gcagcgacat  ccttcggcgc  gattttgccg  8040
gttactgcgc  tgtaccaa  ggggacaac  gtaagcacta  catttcgctc  atcgccagcc  8100
cagtcgggcg  gcgagttcca  tagcgtaag  gtttcattta  gcgcctcaa  tagatcctgt  8160
tcaggaaccg  gatcaaagag  ttctccgcc  gctggacct  ccaaggcaac  gctatgttct  8220
cttgcttttg  tcagcaagat  agccagatca  atgtcgatcg  tggctggctc  gaagatacct  8280
gcaagaatgt  cattgcgctg  ccattctcca  aattgcagtt  cgcgcttagc  tggataacgc  8340
cacggaatga  tgtcgtcgtg  cacaacaatg  gtgacttcta  cagcgcgag  aatctcgctc  8400
tctccagggg  aagccgaagt  ttccaaaagg  tcgttgatca  aagctcgccg  cgttggttca  8460
tcaagcctta  cggtcaccgt  aaccagcaaa  tcaatatcac  tgtgtggctt  caggccgcca  8520
tccactgcgg  agccgtacaa  atgtacggcc  agcaacgtcg  gttcgagatg  gcgctcgatg  8580
acgccaacta  cctctgatag  ttgagtcgat  acttcggcga  tcaccgcttc  ccccatgatg  8640
tttaactttg  ttttagggcg  actgccctgc  tgcgtaacat  cgttgctgct  ccataacatc  8700
aaacatcgac  ccacggcgta  acgcgcttgc  tgcttgatg  cccgaggcat  agactgtacc  8760
ccaaaaaac  agtcataaca  agccatgaaa  accgccactg  cgttccatg  8809

```

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 18

actagtatgt ctgctgctgc tgatag

26

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

&lt;400&gt; 19

ctcgagatct tcatgtagat ctaatt

26

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
oligonucleotide primer

<400> 20  
 gcggccgcca tgtctgctgc tgctgatag 29  
 <210> 21  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 oligonucleotide primer  
 <400> 21  
 gcggccgcat cttcatgtag atctaatt 28  
 <210> 22  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
 sequence motive  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (8)  
 <223> Thr  
 <400> 22  
 Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys  
 1 5 10  
 <210> 23  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
 sequence motive  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (2)  
 <223> Gln  
 <400> 23  
 His Glu Gln Asn Val Lys Tyr Leu  
 1 5  
 <210> 24  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
 sequence motive  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (1)  
 <223> Asn  
 <220>  
 <221> VARIANT

<222> (2)  
<223> Val

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (3)  
<223> Ile

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (5)  
<223> Trp

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (6)  
<223> Asn

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (7)  
<223> Ile or Val

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (12)  
<223> Leu or Ile

<400> 24  
Asp Ile Leu Val Phe Val Leu Pro His Gln Phe Val  
1 5 10

<210> 25  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Gly

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (2)  
<223> Val

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (5)  
<223> Ile

<400> 25  
Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly  
1 5

<210> 26  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (3)  
<223> Ala

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (9)  
<223> Ile or Val

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (13)  
<223> Ile

<400> 26  
Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Xaa Glu Val Ala  
1 5 10

<210> 27  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (1)  
<223> Val

<400> 27  
Leu Phe Xaa Arg Pro Tyr Phe Xaa Val  
1 5

<210> 28  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (2)  
<223> Met

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (3)  
<223> Gly

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (5)  
<223> Ile

<220>  
<221> VARIANT

<222> (6)  
<223> Gln  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (7)  
<223> Lys or Asn  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (9)  
<223> Ser or Ala  
<400> 28  
Gly Leu Leu Glu Met Ile Arg Phe Gly  
1 5  
<210> 29  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (13)  
<223> Ile  
<400> 29  
Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Ile Ala Lys Val Val Ala Glu Asn  
1 5 10 15  
<210> 30  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (3)  
<223> Arg  
<400> 30  
Asn Thr Lys His Gln Asn Val Lys Tyr Leu Pro  
1 5 10  
<210> 31  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (2)  
<223> Val

<220>  
<221> VARIANT  
<222> (7)  
<223> Val  
<400> 31  
Asp Ile Leu Val Phe Asn Ile Pro His Gln Phe Leu  
1 5 10  
<210> 32  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (3)  
<223> Val  
<400> 32  
Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Phe Glu  
1 5 10  
<210> 33  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> (11)  
<223> Thr  
<400> 33  
Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Pro Glu Val Ala  
1 5 10  
<210> 34  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive  
<400> 34  
Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val  
1 5  
<210> 35  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Yeast G3PDH  
sequence motive

```

<220>
<221> VARIANT
<222> (7)
<223> Arg
<400> 35
Gly Leu Gly Glu Ile Ile Lys Phe Gly
  1                               5
<210> 36
<211> 13718
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: expression
      vector pGPTV-gpd1
<220>
<221> promoter
<222> (10807)..(11951)
<223> napin promoter
<220>
<221> terminator
<222> (13154)..(13408)
<223> nos terminator
<220>
<221> misc_feature
<222> (11962)..(13137)
<223> coding for yeast G3PDH (gpd1)
<400> 36
gatctggcgc cggccagcga gacgagcaag attggccgcc gcccgaaacg atccgacagc 60
gcgcccagca caggtgcgca ggcaaattgc accaacgcat acagcgccag cagaatgccca 120
tagtgggcgg tgacgtcggt cgagtgaacc agatcgcgca ggaggcccg cagcaccggc 180
ataatcaggc cgatgccgac agcgtcgagc gcgacagtgc tcagaattac gatcaggggt 240
atggtggggt tcacgtctgg cctccggacc agcctccgct ggtccgattg aacgcgcgga 300
ttctttatca ctgataagtt ggtggacata ttatgtttat cagtgataaa gtgtcaagca 360
tgacaaagtt gcagccgaat acagtgatcc gtgccgccct ggacctgttg aacgaggtcg 420
gcgtagacgg tctgacgaca cgcaaactgg cggaacgggt ggggggttcag cagccggcgc 480
tttactggca cttcaggaac aagcgggcgc tgctcgacgc actggccgaa gccatgctgg 540
cggagaatca tacgcattcg gtgccgagag ccgacgacga ctggcgctca tttctgatcg 600
ggaatgcccc cagcttcagg caggcgctgc tcgcctaccg cgatggcgcg cgcattccatg 660
ccggcacgcg accgggcgca ccgcagatgg aaacggccga cgcgcagctt cgcttccctc 720
gcgaggcggg tttttcggcc ggggacgccg tcaatgcgct gatgacaatc agctacttca 780
ctggttggggc cgtgcttgag gagcaggccg gcgacagcga tgccggcgag cgcggcggca 840
ccgttgaaca ggctccgctc tcgccgctgt tcggggccgc gatagacgcc ttcgacgaag 900
ccggtccgga cgcagcgttc gagcagggac tcgcggtgat tgtcgatgga ttggcgaaaa 960
ggaggctcgt tgtcaggaac gttgaaggac cgagaaaggg tgacgattga tcaggaccgc 1020
tgccggagcg caaccactc actacagcag agccatgtag acaacatccc ctcccccttt 1080
ccaccgcgct agacgcccg agcagcccg tcacgggcttt ttcatgccct gccctagcgt 1140
ccaagcctca cgcccgcgct cggcctctct ggccgccttc tggcgctctt ccgcttctct 1200
gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa 1260
ggcggttaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 1320
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcggtt ctggcggttt tccataggct 1380
ccgccccctt gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaaccgcgac 1440
aggactataa agataaccagg cgtttccccc tgggaagctcc ctctgtcgct ctctgttccc 1500
gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttt 1560
ccgctgcata accctgcttc ggggtcatta tagcgatttt ttcggtatat ccattccttt 1620
tcgcacgata tacaggattt tgccaaaggg ttcgtgtaga ctttccttgg tgtatccaac 1680

```

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ggcgtcagcc  | gggcaggata  | ggtgaagtag  | gccacccgc   | gagcgggtgt  | tcctttcttca | 1740 |
| ctgtccctta  | ttcgcacctg  | gcggtgctca  | acgggaatcc  | tgctctgcga  | ggctggccgg  | 1800 |
| ctaccgccgg  | cgtaacagat  | gagggcaagc  | ggatggctga  | tgaaccaag   | ccaaccagga  | 1860 |
| agggcagccc  | acctatcaag  | gtgtactgcc  | ttccagacga  | acgaagagcg  | attgaggaaa  | 1920 |
| aggcggcgcc  | ggccggcatg  | agcctgtcgg  | cctacctgct  | ggccgtcggc  | cagggctaca  | 1980 |
| aatcacggg   | cgctcgtggac | tatgagcacg  | tccgcgagct  | ggcccgcatc  | aatggcgacc  | 2040 |
| tgggcccgcct | gggcggcctg  | ctgaaactct  | ggctcaccga  | cgacccgcgc  | acggcgcggt  | 2100 |
| tccgtgatgc  | cacgatcctc  | gccctgctgg  | cgaagatcga  | agagaagcag  | gacgagcttg  | 2160 |
| gcaaggtcat  | gatgggcgtg  | gtccgcccga  | gggcagagcc  | atgacttttt  | tagccgctaa  | 2220 |
| aacggccggg  | gggtgcgcgt  | gattgccaaag | cacgtcccca  | tgcgctccat  | caagaagagc  | 2280 |
| gacttcgcgg  | agctggtgaa  | gtacatcacc  | gacgagcaag  | gcaagaccga  | gcgcctttgc  | 2340 |
| gacgtcacc   | gggtcgtgtg  | ccctcgccgc  | tgggctggcg  | gccgtctatg  | gccctgcaaa  | 2400 |
| cgcgccagaa  | acgccgtcga  | agccgtgtgc  | gagacaccgc  | ggccgcccgc  | gttgtggata  | 2460 |
| cctcgcggaa  | aacttggccc  | tactgacag   | atgaggggcg  | gacgttgaca  | cttgaggggc  | 2520 |
| cgactacccc  | ggcgcggcgt  | tgacagatga  | ggggcaggct  | cgatttcggc  | cggcgacgtg  | 2580 |
| gagctggcca  | gcctcgcaaa  | tcggcgaaaa  | cgccgtgattt | tacgcgagtt  | tcccacagat  | 2640 |
| gatgtggaca  | agcctgggga  | taagtgcctt  | gcggtattga  | cacttgaggg  | gcgcgactac  | 2700 |
| tgacagatga  | ggggcgcgat  | ccttgacact  | tgaggggcag  | agtgcctgaca | gatgaggggc  | 2760 |
| gcacctattg  | acatttgagg  | ggctgtccac  | aggcagaaaa  | tccagcattt  | gcaaggggtt  | 2820 |
| ccgcccgttt  | ttcggccacc  | gctaacctgt  | cttttaacct  | gcttttaaac  | caatatattt  | 2880 |
| aaaccttgtt  | tttaaccagg  | gctgcgccct  | gtgcgcgtga  | ccgcgcacgc  | cgaagggggg  | 2940 |
| tgcceccctt  | tctcgaaacc  | tcccggcccg  | ctaaccgcgg  | cctcccatcc  | ccccaggggc  | 3000 |
| ttgcgccttc  | ggccgcgaac  | ggcctcacc   | caaaaatggc  | agcgtcggca  | gtccttgcca  | 3060 |
| ttgccgggat  | cggggcagta  | acgggatggg  | cgatcagccc  | gagcgcgacg  | cccgaagca   | 3120 |
| ttgacgtgcc  | gcaggtgctg  | gcacgcacat  | tcagcgacca  | ggtgccgggc  | agtgagggcg  | 3180 |
| gcggcctggg  | tggcggcctg  | cccttcactt  | cgcccgctcg  | ggcattcacg  | gacttcatgg  | 3240 |
| cggggcgggc  | aatttttacc  | ttgggcattc  | ttggcatagt  | ggtcgcgggt  | gccgtgctcg  | 3300 |
| tggttcgggg  | tgcgataaac  | ccagcgaacc  | atltgaggtg  | ataggttaaga | ttataccgag  | 3360 |
| gtatgaaaac  | gagaattgga  | cctttacaga  | attactctat  | gaagcgccat  | atttaaaaag  | 3420 |
| ctaccaagac  | gaagaggatg  | aagaggatga  | ggaggcagat  | tgcttgaat   | atattgacaa  | 3480 |
| tactgataag  | ataatatatc  | ttttatatag  | aagatatcgc  | cgtatgtaag  | gatttcaggg  | 3540 |
| ggcaaggcat  | aggcagcgcg  | cttatcaata  | tatctataga  | atgggcaaag  | cataaaaact  | 3600 |
| tgcatggact  | aatgcttgaa  | acccaggaca  | ataaccttat  | agcttgtaaa  | ttctatcata  | 3660 |
| attgggtaat  | gactccaact  | tattgatagt  | gttttatgtt  | cagataatgc  | ccgatgactt  | 3720 |
| tgtcatgcag  | ctccaccgat  | tttgagaacg  | acagcgactt  | ccgtcccagc  | cgtgccaggt  | 3780 |
| gctgcctcag  | attcaggtta  | tgccgctcaa  | ttcgctgcgt  | atatcgcttg  | ctgattacgt  | 3840 |
| gcagctttcc  | cttcaggcgg  | gattcataca  | gcggccagcc  | atccgtcatc  | catatcacca  | 3900 |
| cgtcaaaggg  | tgacagcagg  | ctcataagac  | gccccagcgt  | cgccatagtg  | cgttcaccga  | 3960 |
| atacgtgcgc  | aacaaccgtc  | ttccggagac  | tgatcatacgc | gtaaaacagc  | cagcgctggc  | 4020 |
| gcgatttagc  | cccgacatag  | ccccactgtt  | cgtccatttc  | cgcgcagacg  | atgacgtcac  | 4080 |
| tgcccggtcg  | tatgcgcgag  | gttaccgact  | gcggcctgag  | ttttttaagt  | gacgtaaaat  | 4140 |
| cgtgttgagg  | ccaacgcca   | taatgcgggc  | tggtgcccgg  | catccaacgc  | cattcatggc  | 4200 |
| catatcaatg  | attttctggt  | gcgtaccggg  | ttgagaagcg  | gtgtaagtga  | actgcagttg  | 4260 |
| ccatgtttta  | cggcagtgag  | agcagagata  | gcgctgatgt  | ccggcggtgc  | ttttgccgtt  | 4320 |
| acgcaccacc  | ccgtcagtag  | ctgaacagga  | gggacagctg  | atagacacag  | aagccactgg  | 4380 |
| agcacctcaa  | aaacaccatc  | ataactaaa   | tcagtaagtt  | ggcagcatca  | cccataattg  | 4440 |
| tggtttcaaa  | atcggctccg  | tcgatactat  | gttatacgcc  | aactttgaaa  | acaactttga  | 4500 |
| aaaagctggt  | ttctggtatt  | taaggtttta  | gaatgcaagg  | aacagtgaat  | tggagttcgt  | 4560 |
| cttggtataa  | ttagcttctt  | ggggtatctt  | ttaatactgt  | agaaaagagg  | aaggaaataa  | 4620 |
| taaatggcta  | aaatgagaat  | atcaccggaa  | ttgaaaaaac  | tgatcgaaaa  | ataccgctgc  | 4680 |
| gtaaaagata  | cggaagggaat | gtctcctgct  | aaggatatata | agctgggtggg | agaaaatgaa  | 4740 |
| aacctatatt  | taaaaatgac  | ggacagccgg  | tataaaggga  | ccacctatga  | tgtggaacgg  | 4800 |
| gaaaaggaca  | tgatgctatg  | gctggaagga  | aagctgcctg  | ttccaaaggt  | cctgcacttt  | 4860 |
| gaacggcatg  | atggctggag  | caatctgctc  | atgagtgagg  | ccgatggcgt  | cctttgctcg  | 4920 |
| gaagagtatg  | aagatgaaca  | aagccctgaa  | aagattatcg  | agctgtatgc  | ggagtgcac   | 4980 |
| aggctctttc  | actccatcga  | catatcggat  | tgtccctata  | cgaatagctt  | agacagccgc  | 5040 |
| ttagccgaat  | tggattactt  | actgaataac  | gatctggccg  | atgtggattg  | cgaaaactgg  | 5100 |

|             |             |            |             |             |             |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| gaagaagaca  | ctccatttaa  | agatccgcgc | gagctgtatg  | atTTTTTaaa  | gacggaaaaag | 5160 |
| cccgaagagg  | aacttgctct  | ttcccacggc | gacctgggag  | acagcaacat  | ctttgtgaaa  | 5220 |
| gatggcaaag  | taagtggctt  | tattgatctt | gggagaagcg  | gcagggcgga  | caagtggat   | 5280 |
| gacattgcct  | tctgcgtccg  | gtcgcacagg | gaggatatcg  | gggaagaaca  | gtatgtcgag  | 5340 |
| ctatTTTTtg  | acttactggg  | gatcaagcct | gattggggaga | aaataaaata  | ttatatTTta  | 5400 |
| ctggatgaat  | tgTTTTagta  | cctagatgtg | gcgcaacgat  | gccggcgaca  | agcaggagcg  | 5460 |
| caccgacttc  | ttccgcacat  | agtgtTTTTg | ctctcaggcc  | gaggcccacg  | gcaagtattt  | 5520 |
| gggcaagggg  | tcgctggtat  | tcgtgcaggg | caagattcgg  | aataccaagt  | acgagaagga  | 5580 |
| cggccagacg  | gtctacggga  | cgcacttcat | tgccgataag  | gtggattatc  | tggaacacaa  | 5640 |
| ggcaccaggc  | gggtcaaata  | aggaataagg | gcacattgcc  | cggcggtgag  | tcggggcaat  | 5700 |
| cccgaagga   | gggtgaatga  | atcggacgtt | tgaccggaag  | gcatacaggc  | aagaactgat  | 5760 |
| cgacgcgggg  | TTTTccgccg  | aggatgccga | aaccatcgca  | agccgcaccg  | tcctgcgtgc  | 5820 |
| gccccgcgaa  | accttccagt  | cgtcgggtc  | gatggtccag  | caagctacgg  | ccaagatcga  | 5880 |
| gcgcgacagc  | gtgcaactgg  | ctccccctgc | cctgccccgc  | ccatcgcccg  | cgtggagcg   | 5940 |
| ttcgcgtcgt  | ctcgaacagg  | aggcggcagg | tttggcgaa   | tcgatgacca  | tcgacacgcg  | 6000 |
| aggaactatg  | acgaccaaga  | agcgaaaaac | cgccggcgag  | gacctggcaa  | aacagggtcag | 6060 |
| cgaggccaag  | caggccgcgt  | tgctgaaaca | cacgaagcag  | cagatcaagg  | aaatgcagct  | 6120 |
| ttccttgttc  | gatattgcgc  | cgtggccgga | cacgatgcga  | gcgatgccaa  | acgacacggc  | 6180 |
| ccgctctgcc  | ctgttcacca  | cgcgcaacaa | gaaaatcccc  | cgcgaggcgc  | tgcaaaaaca  | 6240 |
| ggtcattttc  | cacgtcaaca  | aggacgtgaa | gatcacctac  | accggcgctc  | agctgcgggc  | 6300 |
| cgacgatgac  | gaactggtgt  | ggcagcaggt | gttgaggtag  | gcgaagcgca  | cccctatcgg  | 6360 |
| cgagccgata  | accttcacgt  | tctacgagct | ttgccaggac  | ctgggctggt  | cgatcaatgg  | 6420 |
| ccggtattac  | acgaaggccg  | aggaatgcct | gtcgcgccta  | caggcgacgg  | cgatgggctt  | 6480 |
| cacgtccgac  | cgcgttgggc  | acctggaata | ggtgtcgcgt  | ctgcaccgct  | tcgcgctcct  | 6540 |
| ggaccgtggc  | aagaaaacgt  | cccgttgcca | ggtcctgatc  | gacgaggaaa  | tcgtcgtgct  | 6600 |
| gtttgctggc  | gaccactaca  | cgaaattcat | atggggagaag | taccgcaagc  | tgtcggcgac  | 6660 |
| ggcccgacgg  | atgttcgact  | atttcagctc | gcaccgggag  | ccgtacccgc  | tcaagctgga  | 6720 |
| aaccttccgc  | ctcatgtgcg  | gatcggattc | caccgcgctg  | aagaagtggc  | gcgagcaggt  | 6780 |
| cggcgaaagc  | tgcgaaagag  | tgcgaggcag | cggcctgggt  | gaacacgcct  | gggtcaatga  | 6840 |
| tgacctggtg  | cattgcaaac  | gctagggcct | tgtgggggtca | gttccggctg  | gggggttcagc | 6900 |
| agccagcgct  | ttactggcat  | ttcaggaaca | agcgggcact  | gctcgacgca  | cttgcttcgc  | 6960 |
| tcagtatcgc  | tcgggacgca  | cggcgcgctc | tacgaactgc  | cgataaacag  | aggattaaaa  | 7020 |
| ttgacaattg  | tgattaaggc  | tcagattcga | cggcttgagg  | cggccgacgt  | gcaggatttc  | 7080 |
| cgcgagatcc  | gattgtcggc  | cctgaagaaa | gctccagaga  | tgctcgggtc  | cgtttacgag  | 7140 |
| cacgaggaga  | aaaagcccat  | ggaggcgctc | gctgaacggg  | tgcgagatgc  | cgtggcattc  | 7200 |
| ggcgccctaca | tcgacggcga  | gatcattggg | ctgtcgggtc  | tcaaacagga  | ggacggcccc  | 7260 |
| aaggacgctc  | acaaggcgca  | tctgtccggc | gttttcgtgg  | agcccgaaca  | gcgaggccga  | 7320 |
| ggggtcgccg  | gtatgctgct  | gcgggcgttg | ccggcggggt  | tattgctcgt  | gatgatcgtc  | 7380 |
| cgacagattc  | caacgggaat  | ctggtggatg | cgcacttcca  | tcctcggcgc  | acttaatat   | 7440 |
| tcgctattct  | ggagcttggt  | gtttatttcg | gtctaccgcc  | tgccggggcg  | ggtcgcggcg  | 7500 |
| acggtagggc  | ctgtgcagcc  | gctgatgggt | gtgttcattc  | ctgccgctct  | gctaggtagc  | 7560 |
| ccgatacgat  | tgatggcggg  | cctgggggct | atTTTgcggaa | ctgcgggcgt  | ggcgctggtg  | 7620 |
| gtgttgacac  | caaacgcagc  | gctagatcct | gtcggcgctc  | cagcgggcct  | ggcggggggc  | 7680 |
| gtttccatgg  | cgttcggaac  | cgtgctgacc | cgcaagtggc  | aacctcccgt  | gcctctgctc  | 7740 |
| acctttaccg  | cctggcaact  | ggcgcccgga | ggacttctgc  | tcgttccagt  | agcttttagtg | 7800 |
| tttgatccgc  | caatcccgat  | gcctacagga | accaatgttc  | tcggcctggc  | gtggctcggc  | 7860 |
| ctgatcggag  | cgggtttaac  | ctacttcctt | tggttccggg  | ggatctcgcg  | actcgaacct  | 7920 |
| acagttgttt  | ccttactggg  | ctttctcagc | cccagatctg  | gggtcgatca  | gccgggggatg | 7980 |
| catcaggccg  | acagtcggaa  | cttcgggttc | ccgacctgta  | ccattcgggtg | agcaatggat  | 8040 |
| aggggagttg  | atatcgtcaa  | cgttcacttc | taaagaaata  | gcgccactca  | gcttctctcag | 8100 |
| cggctttatc  | cagcgatttc  | ctattatgtc | ggcatagttc  | tcaagatcga  | cagcctgtca  | 8160 |
| cggttaagcg  | agaaatgaat  | aagaaggctg | ataattcgga  | tctctgcgag  | ggagatgata  | 8220 |
| tttgatcaca  | ggcagcaacg  | ctctgtcatc | gttacaatca  | acatgctacc  | ctccgcgaga  | 8280 |
| tcacccgtgt  | ttcaaaccgg  | gcagcttagt | tgccgttctt  | ccgaatagca  | tcggtaacat  | 8340 |
| gagcaaagtc  | tgccgcctta  | caacggctct | cccgtgacg   | ccgtcccgga  | ctgatgggct  | 8400 |
| gcctgtatcg  | agtgggtgatt | ttgtgccgag | ctgccggctc  | gggagctggt  | ggctggctgg  | 8460 |
| tggcaggata  | tattgtggtg  | taaacaaatt | gacgcttaga  | caacttaata  | acacattgcg  | 8520 |

|             |             |             |             |             |             |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| gacgtttttaa | atgtactggg  | gtgggtttttc | ttttcaccag  | tgagacgggc  | aacagctgat  | 8580  |
| tgcccttcac  | cgccctggccc | tgagagaggtt | gcagcaagcg  | gtccacgctg  | gtttgccccca | 8640  |
| gcaggcgaaa  | atcctgttttg | atgggtgggtt | cgaaatcggc  | aaaatccctt  | ataaatcaaa  | 8700  |
| agaatagccc  | gagataggggt | tgagtgttgt  | tccagtttgg  | aacaagagtc  | cactattaaa  | 8760  |
| gaacgtggac  | tccaacgtca  | aagggcgaaa  | aaccgtctat  | cagggcgatg  | gccactacg   | 8820  |
| tgaaccatca  | cccaaatcaa  | gttttttggg  | gtcgaggtgc  | cgtaaagcac  | taaatcggaa  | 8880  |
| ccctaaaggg  | agcccccgat  | ttagagcttg  | acggggaaaag | ccggcgaaacg | tggcgagaaa  | 8940  |
| ggaaggggaag | aaagcgaaaag | gagcggggcgc | cattcaggct  | gcgcaactgt  | tgggaagggc  | 9000  |
| gatcgggtgcg | ggcctcttctg | ctattacgcc  | agctggcgaa  | agggggatgt  | gctgcaaggc  | 9060  |
| gattaagttg  | ggtaacgccca | gggttttccc  | agtcacgacg  | ttgtaaaacg  | acggccagtg  | 9120  |
| aattaattcc  | catcttgaaa  | gaaatatagt  | ttaaatatatt | attgataaaa  | taacaagtca  | 9180  |
| ggtattatag  | tccaagcaaa  | aacataaatt  | tattgatgca  | agtttaaat   | cagaaatatt  | 9240  |
| tcaataactg  | attatatcag  | ctggtacatt  | gccgtagatg  | aaagactgag  | tgcgatatta  | 9300  |
| tgtgtaatac  | ataaattgat  | gatatagcta  | gcttagctca  | tcgggggatc  | cgtcgaagct  | 9360  |
| agcttggggtc | ccgctcagaa  | gaactcgtca  | agaaggcgat  | agaaggcgat  | gcgctgcgaa  | 9420  |
| tcggggagcgg | cgataccgta  | aagcacgagg  | aagcggtcag  | cccattcgcc  | gccaagctct  | 9480  |
| tcagcaatat  | cacgggtagc  | caacgctatg  | tcctgatagc  | ggtccgccac  | accagccgg   | 9540  |
| ccacagtcga  | tgaatccaga  | aaagcggcca  | ttttccacca  | tgatattcgg  | caagcaggca  | 9600  |
| tcgccatggg  | tcacgacgag  | atcctcgccg  | tcgggcatgc  | gcgccttgag  | cctggcgaa   | 9660  |
| agttcgggtg  | gcgcgagccc  | ctgatgctct  | tcgtccagat  | catcctgatc  | gacaagaccg  | 9720  |
| gcttccatcc  | gagtagctgc  | tcgctcgatg  | cgatgtttcg  | cttgggtggc  | gaatgggcag  | 9780  |
| gtagccggat  | caagcgtatg  | cagccgccc   | attgcatcag  | ccatgatgga  | tactttctcg  | 9840  |
| gcaggagcaa  | ggtgagatga  | caggagatcc  | tgccccggca  | cttcgcccaa  | tagcagccag  | 9900  |
| tccttcccg   | cttcagtgac  | aacgtcgagc  | acagctgcgc  | aaggaacgcc  | cgtcgtggcc  | 9960  |
| agccacgata  | gccgcgctgc  | ctcgtcctgc  | agttcattca  | gggcaccgga  | caggtcggtc  | 10020 |
| ttgacaaaaa  | gaaccgggcg  | ccctcgctct  | gacagccgga  | acacggcgcc  | atcagagcag  | 10080 |
| ccgattgtct  | gttgtgccc   | gtcatagccg  | aatagcctct  | ccaccaagc   | ggccggagaa  | 10140 |
| cctgcgtgca  | atccatcttg  | ttcaatccaa  | gctcccatgg  | gccctcgact  | agagtcgaga  | 10200 |
| tctggattga  | gagtgaatat  | gagactctaa  | ttggataccg  | aggggaattt  | atggaacgtc  | 10260 |
| agtggagcat  | ttttgacaag  | aaatatgtgc  | tagctgatag  | tgaccttagg  | cgacttttga  | 10320 |
| acgcgcaata  | atgggtttctg | acgtatgtgc  | ttagctcatt  | aaactccaga  | aaccgcggc   | 10380 |
| tgagtgggtc  | cttcaacggt  | gcggttctgt  | cagttccaaa  | cgtaaaacgg  | cttgtcccgc  | 10440 |
| gtcatcggcg  | ggggtcataa  | cgtgactccc  | ttaattctcc  | gctcatgatc  | ttgatcccct  | 10500 |
| gcgccatcag  | atccttggcg  | gcaagaaagc  | catccagttt  | actttgcagg  | gcttcccaac  | 10560 |
| cttaccagag  | ggcgccccag  | ctggcaattc  | cggttcgctt  | gctgtccata  | aaaccgcca   | 10620 |
| gtctagctat  | cgccatgtaa  | gcccactgca  | agctacctgc  | tttctctttg  | cgcttgcggt  | 10680 |
| ttcccttgct  | cagatagccc  | agtagctgac  | attcatccgg  | ggtcagcacc  | gtttctgcgg  | 10740 |
| actggcttct  | tacgtgttcc  | gcttccttta  | gcagcccttg  | cgccctgagt  | gcttgccgca  | 10800 |
| gcgtgaagct  | ttcttcatcg  | gtgattgatt  | cctttaaaga  | cttatgtttc  | ttatcttgct  | 10860 |
| tctgaggcaa  | gtattcagtt  | accagttacc  | acttatattc  | tggactttct  | gactgcatcc  | 10920 |
| tcatttttcc  | aacattttta  | atttcactat  | tggctgaatg  | cttcttcttt  | gaggaagaaa  | 10980 |
| caattcagat  | ggcagaaatg  | tatcaaccaa  | tgcatatata  | caaagtacc   | tcttgttctc  | 11040 |
| aaaacatcta  | tcggatgggt  | ccatttgctt  | tgtcatccaa  | ttagtacta   | ctttatatta  | 11100 |
| ttcactcctc  | tttattacta  | ttttcatgcg  | aggttgccat  | gtacattata  | tttgtaagga  | 11160 |
| ttgacgctat  | tgagcgtttt  | tcttcaattt  | tctttatatt  | agacatgggt  | atgaaatgtg  | 11220 |
| tgttagagtt  | gggttgaatg  | agatatacgt  | tcaagtgaat  | ggcataccgt  | tctcgagtaa  | 11280 |
| ggatgacct   | cccattcttg  | agacaaatgt  | tacatttttag | tatcagagta  | aatgtgttac  | 11340 |
| ctataactca  | aattcgattg  | acatgtatcc  | attcaacata  | aaattaaacc  | agcctgcacc  | 11400 |
| tgcatccaca  | tttcaagtat  | tttcaaaccg  | ttcggtcct   | atccaccggg  | tgtacaaga   | 11460 |
| cggattccga  | atttgaaga   | ttttgactca  | aattcccaat  | ttatattgac  | cgtgactaaa  | 11520 |
| tcaactttta  | cttctataat  | tctgattaag  | ctcccaattt  | atattcccaa  | cggcactacc  | 11580 |
| tccaaaattt  | atagactctc  | atcccccttt  | aaaccaactt  | agtaaacggt  | ttttttttta  | 11640 |
| attttatgaa  | gttaagtgtt  | taccttggtt  | ttaaaaagaa  | tcgttcataa  | gatgccatgc  | 11700 |
| cagaacatta  | gctacacggt  | acacatagca  | tgcagccgcg  | gagaattggt  | tttcttcgcc  | 11760 |
| acttgctact  | cccttcaaac  | acctaagagc  | ttctctctca  | cagcacacac  | atacaatcac  | 11820 |
| atgcgtgcat  | gcattattac  | acgtgatcgc  | catgcaaate  | tcctttatag  | cctataaatt  | 11880 |
| aactcatccg  | cttactctct  | tactcaaacc  | aaaactcatc  | aatacaaaaca | agattaaaaa  | 11940 |

```

catacacgag gatccactag tatgtctgct gctgctgata gattaaactt aacttccggc 12000
cacttgaatg ctggtagaaa gagaagttcc tcttctgttt ctttgaaggc tgccgaaaag 12060
cctttcaagg ttactgtgat tggatctggt aactggggta ctactattgc caaggtggtt 12120
gccgaaaatt gtaagggaata cccagaagtt ttcgctccaa tagtacaat gtgggtgttc 12180
gaagaagaga tcaatggtga aaaattgact gaaatcataa atactagaca tcaaaacgtg 12240
aaatacttgc ctggcatcac tctacccgac aatttggttg ctaatccaga cttgattgat 12300
tcagtcaagg atgtcgacat catcgtcttc aacattccac atcaattttt gcccggtatc 12360
tgtagccaat tgaaagggtca tgttgattca cacgtcagag ctatctcctg tctaaagggt 12420
tttgaagttg gtgctaaagg tgtccaattg ctatcctctt acatcactga ggaactaggt 12480
attcaatgtg gtgctctatc tgggtgtaac attgccactg aagtcgctca agaactactg 12540
tctgaacaa cagttgctta ccacattcca aaggatttca gaggcgaggg caaggacgtc 12600
gaccataagg ttctaaaggc cttgttccac agaccttact tccacgttag tgtcatcgaa 12660
gatgttgctg gtatctccat ctgtggtgct ttgaagaacg ttgttgccct aggttgtggt 12720
ttcgtcgaag gtctaggctg gggtaacaac gcttctgctg ccatccaaag agtcgggtttg 12780
ggtgagatca tcagattcgg tcaaatgttt tcccagaat ctagagaaga aacatactac 12840
caagagtctg ctggtgttgc tgatttgatc accacctgcg ctggtggtag aaacgtcaag 12900
gttgctaggc taatggctac ttctggtaag gacgcctggg aatgtgaaaa ggagttgttg 12960
aatggccaat ccgctcaagg tttaattacc tgcaaagaag ttcacgaatg gttggaaaca 13020
tgtggctctg tcgaagactt cccattattt gaagccgtat accaaatcgt ttacaacaac 13080
tacccaatga agaacctgcc ggacatgatt gaagaattag atctacatga agattagctc 13140
gacgaatttc cccgatcggt caaacatttg gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt 13200
tgccggtctt gcgatgatta tcatataatt tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat 13260
taacatgtaa tgcgatgacg tattttatgag atgggttttt atgattagag tcccgcatt 13320
atacatttaa tacgcgatag aaaacaaaat atagcgcgca aactaggata aattatcgcg 13380
cgcggtgtca tctatgttac tagatcggga attcagatcg gctgagtggc tccttcaacg 13440
ttgcggtct gtcagtncca aacgtaaaac ggggttggtcc gcggnatcgg gcggggggcc 13500
ttaaccgtgn actnccntna ttntccggc ttcantgnnn agaattggnc ntttccccgn 13560
cntcagttta aactatcagg tgtttgacag gatataattg gcgggtaaac ctaaganaaa 13620
agagcgttta ttagaataat cggatattta aaagggccgn gaaaaggttt atcccttccg 13680
tccatttgta tngncatgcc naccaccagg gttcccca 13718

```

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 1254

&lt;212&gt; DNA

<213> *Emericella nidulans*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1251)

&lt;223&gt; coding for G3PDH

&lt;400&gt; 37

```

atg ggc tct ctt gga ccg tat aag caa aag cac aag gtg act gtg gtg 48
Met Gly Ser Leu Gly Pro Tyr Lys Gln Lys His Lys Val Thr Val Val
  1             5             10             15

gga tcg ggt aac tgg ggc acc gct ata gcc aaa atc gtc gcc gag aat 96
Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Val Ala Glu Asn
             20             25             30

act gcc agc aac cct gcg gtc ttt gag aag gat gtt cag atg tgg gtt 144
Thr Ala Ser Asn Pro Ala Val Phe Glu Lys Asp Val Gln Met Trp Val
             35             40             45

ttc gag gaa aag gtc gag att ccg aaa tcg tcg aag cat tat gat cct 192
Phe Glu Glu Lys Val Glu Ile Pro Lys Ser Ser Lys His Tyr Asp Pro
             50             55             60

gcc tct tct ctt tgc cag ggc ccg cag aat ctg aca gat att atc aac 240
Ala Ser Ser Leu Cys Gln Gly Pro Gln Asn Leu Thr Asp Ile Ile Asn
             65             70             75             80

```

## 36

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| cat acc cat gag aat atc aag tac ctc ccc gga att acc ctt ccg gaa | 288  |
| His Thr His Glu Asn Ile Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Thr Leu Pro Glu |      |
| 85 90 95                                                        |      |
| aac ttg att gcc aat cca tcg cta gtc gac gcg gtt caa gac agc act | 336  |
| Asn Leu Ile Ala Asn Pro Ser Leu Val Asp Ala Val Gln Asp Ser Thr |      |
| 100 105 110                                                     |      |
| atc ctc gtc ttc aac cta ccc cat caa ttc atc atc aat att tgt gaa | 384  |
| Ile Leu Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe Ile Ile Asn Ile Cys Glu |      |
| 115 120 125                                                     |      |
| cag atc aag ggc aag att gtc cca tac gcg cgt gga att tct tgc ata | 432  |
| Gln Ile Lys Gly Lys Ile Val Pro Tyr Ala Arg Gly Ile Ser Cys Ile |      |
| 130 135 140                                                     |      |
| aag ggc gtg gat gtg aat gag gaa gga gtc cac ctg ttt tcc gaa aca | 480  |
| Lys Gly Val Asp Val Asn Glu Glu Gly Val His Leu Phe Ser Glu Thr |      |
| 145 150 155 160                                                 |      |
| att gga aag att ctc ggg atc tac tgt ggc gcc ctg tcc ggt gcc aac | 528  |
| Ile Gly Lys Ile Leu Gly Ile Tyr Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn |      |
| 165 170 175                                                     |      |
| atc gcg aat gag gtc gcc cag gaa aag tgg tcc gag tct agc att ggt | 576  |
| Ile Ala Asn Glu Val Ala Gln Glu Lys Trp Ser Glu Ser Ser Ile Gly |      |
| 180 185 190                                                     |      |
| tat gat cca ccg cat ttt gac tct aaa gcc cct tct cct ccc aac cga | 624  |
| Tyr Asp Pro Pro His Phe Asp Ser Lys Ala Pro Ser Pro Pro Asn Arg |      |
| 195 200 205                                                     |      |
| tcc cct tcc gca tcg act gac aat atc ctg cac ttc gag cac aaa gac | 672  |
| Ser Pro Ser Ala Ser Thr Asp Asn Ile Leu His Phe Glu His Lys Asp |      |
| 210 215 220                                                     |      |
| gtt tcg ggt caa ctt tcg cgg gta aag cta cag gct cta cct tcc gaa | 720  |
| Val Ser Gly Gln Leu Ser Arg Val Lys Leu Gln Ala Leu Pro Ser Glu |      |
| 225 230 235 240                                                 |      |
| ttt cct ccc atc gac cat gcc ctt ctc aag tcg cta ttc cac cgt cct | 768  |
| Phe Pro Pro Ile Asp His Ala Leu Leu Lys Ser Leu Phe His Arg Pro |      |
| 245 250 255                                                     |      |
| tac ttc cat att ggt gtg gta agt gac gtc gca ggt gtt tcg tta gga | 816  |
| Tyr Phe His Ile Gly Val Val Ser Asp Val Ala Gly Val Ser Leu Gly |      |
| 260 265 270                                                     |      |
| ggt gcc ctt aag aat gtc gtt gct gtc gcg gca ggg tgg gtt gtg ggc | 864  |
| Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Val Ala Ala Gly Trp Val Val Gly |      |
| 275 280 285                                                     |      |
| aaa gga tgg gga gac aat gcg aag gct gca att atg cga gtt ggg ctt | 912  |
| Lys Gly Trp Gly Asp Asn Ala Lys Ala Ala Ile Met Arg Val Gly Leu |      |
| 290 295 300                                                     |      |
| ttg gaa atg gtg aag ttc ggc gaa cag ttt ttc ggt gct acc atc aac | 960  |
| Leu Glu Met Val Lys Phe Gly Glu Gln Phe Phe Gly Ala Thr Ile Asn |      |
| 305 310 315 320                                                 |      |
| act cgc acc ttc act gaa gaa agt gct ggt gtt gcc gat cta atc acg | 1008 |
| Thr Arg Thr Phe Thr Glu Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr |      |
| 325 330 335                                                     |      |
| agt tgc agt ggc gga cga aac ttc cgc tgc gca aag ctt agc att gaa | 1056 |
| Ser Cys Ser Gly Gly Arg Asn Phe Arg Cys Ala Lys Leu Ser Ile Glu |      |
| 340 345 350                                                     |      |

## 37

```

aga aac cag ccg att gag aaa atc gag gag aca gag ttg aac ggc cag 1104
Arg Asn Gln Pro Ile Glu Lys Ile Glu Glu Thr Glu Leu Asn Gly Gln
      355                      360                      365

aag ctg caa ggc act ttg act gca gtc gaa gtc aac agt ttc ttg aaa 1152
Lys Leu Gln Gly Thr Leu Thr Ala Val Glu Val Asn Ser Phe Leu Lys
      370                      375                      380

aag caa ggt tta gaa gaa gag ttc cca ttg ttt act gca gtc tac cga 1200
Lys Gln Gly Leu Glu Glu Glu Phe Pro Leu Phe Thr Ala Val Tyr Arg
      385                      390                      395                      400

gtt ctt caa ggc acc atg tct gtg gac gag att cct tct ttc att gag 1248
Val Leu Gln Gly Thr Met Ser Val Asp Glu Ile Pro Ser Phe Ile Glu
      405                      410                      415

cgg taa 1254
Arg

<210> 38
<211> 417
<212> PRT
<213> Emericella nidulans

<400> 38
Met Gly Ser Leu Gly Pro Tyr Lys Gln Lys His Lys Val Thr Val Val
 1          5          10          15
Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Ala Ile Ala Lys Ile Val Ala Glu Asn
      20          25          30
Thr Ala Ser Asn Pro Ala Val Phe Glu Lys Asp Val Gln Met Trp Val
      35          40          45
Phe Glu Glu Lys Val Glu Ile Pro Lys Ser Ser Lys His Tyr Asp Pro
      50          55          60
Ala Ser Ser Leu Cys Gln Gly Pro Gln Asn Leu Thr Asp Ile Ile Asn
      65          70          75          80
His Thr His Glu Asn Ile Lys Tyr Leu Pro Gly Ile Thr Leu Pro Glu
      85          90          95
Asn Leu Ile Ala Asn Pro Ser Leu Val Asp Ala Val Gln Asp Ser Thr
      100          105          110
Ile Leu Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe Ile Ile Asn Ile Cys Glu
      115          120          125
Gln Ile Lys Gly Lys Ile Val Pro Tyr Ala Arg Gly Ile Ser Cys Ile
      130          135          140
Lys Gly Val Asp Val Asn Glu Glu Gly Val His Leu Phe Ser Glu Thr
      145          150          155          160
Ile Gly Lys Ile Leu Gly Ile Tyr Cys Gly Ala Leu Ser Gly Ala Asn
      165          170          175
Ile Ala Asn Glu Val Ala Gln Glu Lys Trp Ser Glu Ser Ser Ile Gly
      180          185          190
Tyr Asp Pro Pro His Phe Asp Ser Lys Ala Pro Ser Pro Pro Asn Arg
      195          200          205
Ser Pro Ser Ala Ser Thr Asp Asn Ile Leu His Phe Glu His Lys Asp
      210          215          220
Val Ser Gly Gln Leu Ser Arg Val Lys Leu Gln Ala Leu Pro Ser Glu
      225          230          235          240

```

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Phe        | Pro        | Pro        | Ile        | Asp<br>245 | His        | Ala        | Leu        | Leu        | Lys<br>250 | Ser        | Leu        | Phe        | His        | Arg<br>255 | Pro        |
| Tyr        | Phe        | His        | Ile<br>260 | Gly        | Val        | Val        | Ser        | Asp<br>265 | Val        | Ala        | Gly        | Val        | Ser<br>270 | Leu        | Gly        |
| Gly        | Ala        | Leu        | Lys<br>275 | Asn        | Val        | Val        | Ala<br>280 | Val        | Ala        | Ala        | Gly        | Trp<br>285 | Val        | Val        | Gly        |
| Lys        | Gly<br>290 | Trp        | Gly        | Asp        | Asn        | Ala<br>295 | Lys        | Ala        | Ala        | Ile        | Met<br>300 | Arg        | Val        | Gly        | Leu        |
| Leu<br>305 | Glu        | Met        | Val        | Lys        | Phe<br>310 | Gly        | Glu        | Gln        | Phe<br>315 | Phe        | Gly        | Ala        | Thr        | Ile        | Asn<br>320 |
| Thr        | Arg        | Thr        | Phe        | Thr<br>325 | Glu        | Glu        | Ser        | Ala        | Gly<br>330 | Val        | Ala        | Asp        | Leu        | Ile<br>335 | Thr        |
| Ser        | Cys        | Ser        | Gly<br>340 | Gly        | Arg        | Asn        | Phe        | Arg<br>345 | Cys        | Ala        | Lys        | Leu        | Ser<br>350 | Ile        | Glu        |
| Arg        | Asn        | Gln<br>355 | Pro        | Ile        | Glu        | Lys        | Ile<br>360 | Glu        | Glu        | Thr        | Glu        | Leu        | Asn<br>365 | Gly        | Gln        |
| Lys        | Leu<br>370 | Gln        | Gly        | Thr        | Leu        | Thr<br>375 | Ala        | Val        | Glu        | Val        | Asn<br>380 | Ser        | Phe        | Leu        | Lys        |
| Lys<br>385 | Gln        | Gly        | Leu        | Glu        | Glu<br>390 | Glu        | Phe        | Pro        | Leu        | Phe<br>395 | Thr        | Ala        | Val        | Tyr        | Arg<br>400 |
| Val        | Leu        | Gln        | Gly        | Thr<br>405 | Met        | Ser        | Val        | Asp<br>410 | Glu        | Ile        | Pro        | Ser        | Phe        | Ile<br>415 | Glu        |

```
<210> 39
<211> 999
<212> DNA
<213> Debaryomyces hansenii
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(996)
<223> coding for G3PDH (partial)
```

|                                                                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <400> 39                                                        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| gga                                                             | tct | ggt | aac | tgg | ggt | act | gct | gtt | gct | aag | atc | gta | tct | gaa | aac | 48  |
| Gly                                                             | Ser | Gly | Asn | Trp | Gly | Thr | Ala | Val | Ala | Lys | Ile | Val | Ser | Glu | Asn |     |
| 1                                                               |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| acg gct gaa aaa cca gaa gtg ttc gaa aag caa gtg aac atg tgg gtt |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 96  |
| Thr                                                             | Ala | Glu | Lys | Pro | Glu | Val | Phe | Glu | Lys | Gln | Val | Asn | Met | Trp | Val |     |
|                                                                 |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |
| ttt gaa gaa gaa gtt gac gga caa aag ttg act gaa atc atc aac gcc |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 144 |
| Phe                                                             | Glu | Glu | Glu | Val | Asp | Gly | Gln | Lys | Leu | Thr | Glu | Ile | Ile | Asn | Ala |     |
|                                                                 |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |
| aaa cac gaa aac gtt aag tac ttg cca gaa gtc aag ttg ccg gaa aac |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 192 |
| Lys                                                             | His | Glu | Asn | Val | Lys | Tyr | Leu | Pro | Glu | Val | Lys | Leu | Pro | Glu | Asn |     |
|                                                                 | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| ttg gtt gca aac cca gac gtt gtt gac act gtc aag gat gca gac tta |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 240 |
| Leu                                                             | Val | Ala | Asn | Pro | Asp | Val | Val | Asp | Thr | Val | Lys | Asp | Ala | Asp | Leu |     |
| 65                                                              |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |

## 39

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| tta att ttt aac att cca cat caa ttc tta cca aga gtg tgt aag caa | 288 |
| Leu Ile Phe Asn Ile Pro His Gln Phe Leu Pro Arg Val Cys Lys Gln |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| ttg gtt ggc cat gtc aag cca tct gcc aga gcc atc tcc tgt ttg aag | 336 |
| Leu Val Gly His Val Lys Pro Ser Ala Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| ggt ttg gaa gtt ggc cca gaa ggt tgt aag ttg tta tcg caa tct atc | 384 |
| Gly Leu Glu Val Gly Pro Glu Gly Cys Lys Leu Leu Ser Gln Ser Ile |     |
| 115 120 125                                                     |     |
| aac gat act tta ggt gtc cac tgt ggt gtc tta tct ggt gcc aac att | 432 |
| Asn Asp Thr Leu Gly Val His Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn Ile |     |
| 130 135 140                                                     |     |
| gcc aac gaa gtt gcc aga gaa aga tgg tct gaa acc acc att gcc tac | 480 |
| Ala Asn Glu Val Ala Arg Glu Arg Trp Ser Glu Thr Thr Ile Ala Tyr |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |
| aac att cca gaa gat ttc aga ggt aag ggt aga gat atc gac gaa tac | 528 |
| Asn Ile Pro Glu Asp Phe Arg Gly Lys Gly Arg Asp Ile Asp Glu Tyr |     |
| 165 170 175                                                     |     |
| gtc tta aag caa tta ttc cac aga acc tac ttc cat gtc aga gtc atc | 576 |
| Val Leu Lys Gln Leu Phe His Arg Thr Tyr Phe His Val Arg Val Ile |     |
| 180 185 190                                                     |     |
| aac gac atc ata ggt gct tct ttc gct ggt gct ttg aag aat gtt gtt | 624 |
| Asn Asp Ile Ile Gly Ala Ser Phe Ala Gly Ala Leu Lys Asn Val Val |     |
| 195 200 205                                                     |     |
| gcc tgt gct gtt ggt ttc gtt atc ggt gcc ggc tgg ggt gac aac gct | 672 |
| Ala Cys Ala Val Gly Phe Val Ile Gly Ala Gly Trp Gly Asp Asn Ala |     |
| 210 215 220                                                     |     |
| aag gcc gct atc atg aga atc ggt atc aga gaa atc atc cac ttt gcc | 720 |
| Lys Ala Ala Ile Met Arg Ile Gly Ile Arg Glu Ile Ile His Phe Ala |     |
| 225 230 235 240                                                 |     |
| tct tac tac caa aag ttc ggt gtc aag ggt cca gct cca gaa tcc act | 768 |
| Ser Tyr Tyr Gln Lys Phe Gly Val Lys Gly Pro Ala Pro Glu Ser Thr |     |
| 245 250 255                                                     |     |
| act ttc act gag gaa tct gcc ggt gtc gct gac tta atc acc act tgt | 816 |
| Thr Phe Thr Glu Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Thr Cys |     |
| 260 265 270                                                     |     |
| tcc ggt ggt aga aat gtc aag gtt gct aga tac atg att gaa aac aac | 864 |
| Ser Gly Gly Arg Asn Val Lys Val Ala Arg Tyr Met Ile Glu Asn Asn |     |
| 275 280 285                                                     |     |
| gtt gac gct tgg gaa gcc gaa aag att gtc tta aag ggt caa tct tct | 912 |
| Val Asp Ala Trp Glu Ala Glu Lys Ile Val Leu Lys Gly Gln Ser Ser |     |
| 290 295 300                                                     |     |
| caa ggt atc tta act gcc aag gaa gtc cac gaa ttg tta act aac tac | 960 |
| Gln Gly Ile Leu Thr Ala Lys Glu Val His Glu Leu Leu Thr Asn Tyr |     |
| 305 310 315 320                                                 |     |
| aac tta tcg aat gaa ttc cca tta ttt gaa gcc gta tac             | 999 |
| Asn Leu Ser Asn Glu Phe Pro Leu Phe Glu Ala Val                 |     |
| 325 330                                                         |     |

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 332

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Debaryomyces hansenii

&lt;400&gt; 40

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Gly | Ser | Gly | Asn | Trp | Gly | Thr | Ala | Val | Ala | Lys | Ile | Val | Ser | Glu | Asn |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |  |
| Thr | Ala | Glu | Lys | Pro | Glu | Val | Phe | Glu | Lys | Gln | Val | Asn | Met | Trp | Val |  |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |  |
| Phe | Glu | Glu | Glu | Val | Asp | Gly | Gln | Lys | Leu | Thr | Glu | Ile | Ile | Asn | Ala |  |
|     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |  |
| Lys | His | Glu | Asn | Val | Lys | Tyr | Leu | Pro | Glu | Val | Lys | Leu | Pro | Glu | Asn |  |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |  |
| Leu | Val | Ala | Asn | Pro | Asp | Val | Val | Asp | Thr | Val | Lys | Asp | Ala | Asp | Leu |  |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |  |
| Leu | Ile | Phe | Asn | Ile | Pro | His | Gln | Phe | Leu | Pro | Arg | Val | Cys | Lys | Gln |  |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |  |
| Leu | Val | Gly | His | Val | Lys | Pro | Ser | Ala | Arg | Ala | Ile | Ser | Cys | Leu | Lys |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |  |
| Gly | Leu | Glu | Val | Gly | Pro | Glu | Gly | Cys | Lys | Leu | Leu | Ser | Gln | Ser | Ile |  |
|     |     |     | 115 |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |  |
| Asn | Asp | Thr | Leu | Gly | Val | His | Cys | Gly | Val | Leu | Ser | Gly | Ala | Asn | Ile |  |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
| Ala | Asn | Glu | Val | Ala | Arg | Glu | Arg | Trp | Ser | Glu | Thr | Thr | Ile | Ala | Tyr |  |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
| Asn | Ile | Pro | Glu | Asp | Phe | Arg | Gly | Lys | Gly | Arg | Asp | Ile | Asp | Glu | Tyr |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |  |
| Val | Leu | Lys | Gln | Leu | Phe | His | Arg | Thr | Tyr | Phe | His | Val | Arg | Val | Ile |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |  |
| Asn | Asp | Ile | Ile | Gly | Ala | Ser | Phe | Ala | Gly | Ala | Leu | Lys | Asn | Val | Val |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |  |
| Ala | Cys | Ala | Val | Gly | Phe | Val | Ile | Gly | Ala | Gly | Trp | Gly | Asp | Asn | Ala |  |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |  |
| Lys | Ala | Ala | Ile | Met | Arg | Ile | Gly | Ile | Arg | Glu | Ile | Ile | His | Phe | Ala |  |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Ser | Tyr | Tyr | Gln | Lys | Phe | Gly | Val | Lys | Gly | Pro | Ala | Pro | Glu | Ser | Thr |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |  |
| Thr | Phe | Thr | Glu | Glu | Ser | Ala | Gly | Val | Ala | Asp | Leu | Ile | Thr | Thr | Cys |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |  |
| Ser | Gly | Gly | Arg | Asn | Val | Lys | Val | Ala | Arg | Tyr | Met | Ile | Glu | Asn | Asn |  |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |  |
| Val | Asp | Ala | Trp | Glu | Ala | Glu | Lys | Ile | Val | Leu | Lys | Gly | Gln | Ser | Ser |  |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |  |
| Gln | Gly | Ile | Leu | Thr | Ala | Lys | Glu | Val | His | Glu | Leu | Leu | Thr | Asn | Tyr |  |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |  |
| Asn | Leu | Ser | Asn | Glu | Phe | Pro | Leu | Phe | Glu | Ala | Val |     |     |     |     |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     |     |     |  |