

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1560/92

(22) Anmeldetag: 31. 7.1992

(42) Beginn der Patentdauer: 15.12.1994

(45) Ausgabetag: 25. 8.1995

(51) Int.Cl.⁶ : C12N 15/55
C12N 9/16

(56) Entgegenhaltungen:

EP 0318775A EP 0331376A EP 0443063A EP 0451452A

(73) Patentinhaber:

SCHWAB HELMUT DIPL.ING. DR.
A-8043 GRAZ, STEIERMARK (AT).

(72) Erfinder:

SCHWAB HELMUT DIPL.ING. DR.
GRAZ, STEIERMARK (AT).
STUBENRAUCH GERHARD DIPL.ING. DR.
WIEN (AT).
GRIENGL HERFRIED DIPL.ING. DR.
GRAZ, STEIERMARK (AT).
KLEMPNER NORBERT DR.
GRAZ, STEIERMARK (AT).
FABER KURT DIPL.ING. DR.
GRAZ, STEIERMARK (AT).

(54) ESTERASE AUS PSEUDOMONAS MARGINATA

(57) Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine neue Esterase, die über gentechnische Strategien zugänglich gemacht wurde. Die in dieser Erfindung beschriebene Esterase ist bei einer Reihe von Carboxylestern, einschließlich Triglyceriden, Fettsäure-Nitrophenylestern und verschiedensten Estern mit sekundären Alkoholen aktiv. Durch Klonierung des entsprechenden Gens aus dem Bakterium *Pseudomonas marginata*, Stamm ATCC 10248, und Überexpression des Gens in Mikroorganismen können aktive Enzympräparationen hergestellt werden. Solche Enzympräparationen können vorzugsweise in der organischen Synthese für Esterspaltungen und Umesterungen eingesetzt werden, wobei gegebenenfalls Enantioselektivität bei den Umsetzungen erzielt werden kann.

AT 399 886 B

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein neues hydrolytisches Enzym aus einem Bakterium des Genus *Pseudomonas*, sowie auf DNA-Moleküle, die für dieses Enzym kodieren und weiters auf Verfahren zur Herstellung von Enzympräparationen und zur Durchführung von enzymkatalysierten chemischen Reaktionen mit dieses Enzym enthaltenden Präparationen.

5 Enzyme haben in der Biotechnologie eine große Bedeutung erlangt. Enzymatische Umsetzungen werden bereits in vielen Bereichen wie Lebens- und Genußmittelindustrie, Waschmittelerzeugung, Aminosäureherstellung und nicht zuletzt in der organischen Synthese eingesetzt (Diekmann und Metz: Grundlagen und Praxis der Biotechnologie, Gustav Fischer Verlag, 1991; Griengl und Königsberger, Österr. Chemiezeit-
10 schrift, Nr. 6, 1991, 188-191). Unter den dafür eingesetzten Enzymen sind vorwiegend hydrolytische Enzyme (Hydrolasen) zu finden. Unter den Hydrolasen haben Esterasen eine besondere Bedeutung für organische Synthesen erlangt. Als Esterasen werden allgemein Enzyme bezeichnet, die die Hydrolyse von Substraten mit Esterbindungen katalysieren. Die Esterasen werden entsprechend ihrer Substratspezifitäten (z.B. Carboxylester, Phosphorsäureester, Thioester, Schwefelsäureester, etc.) klassifiziert. In einem engeren Sinn wird der Begriff "Esterasen" für Enzyme verwendet, die in der Lage sind, Ester mit vorwiegend
15 kurzkettigen (Fett-)Säuren zu spalten. Mit "Esterasen" werden somit esterolytische Enzyme von den "Lipasen", einer spezifischen Gruppe von Esterasen, die vorwiegend die Spaltung von Glycerin-Fettsäureestern katalysiert (Macrae, A.R.: Extracellular Microbial Lipases. in: Fogarty, W.M., ed.: Microbial Enzymes and Biotechnology, Applied Science Publishers, London, 1983, pp. 225-250), abgegrenzt. Im folgenden wird der Begriff "Esterase" in diesem engeren Sinn für diese Klasse von Enzymen verwendet.

20 Zellen besitzen üblicherweise eine Vielzahl von Esterasen, deren physiologische Rolle in vielen Fällen noch nicht geklärt ist. So konnten z.B. vier verschiedene Esterasen in *Aspergillus niger* (Okumura et al., Agric. Biol. Chem., 47:1869-1872, 1983) mit unterschiedlichen Eigenschaften aber ähnlichen Substratspezifitäten oder zwei verschiedene Esterasen in *Pseudomonas fluorescens* (Nakagawa et al., J. Biochem., 95:1047-1054, 1984; Choi et al., Agric. Biol. Chem., 54:2039-2045, 1990) mit unterschiedlichen Substratspezifitäten
25 gefunden werden.

In den letzten Jahren wurden vielfältige Versuche unternommen, Esterasen in der organischen Synthese einzusetzen; unter anderem auch zur Herstellung optisch aktiver Verbindungen oder zur Gewinnung chiraler Substanzen aus prochiralen Ausgangsmaterialien.

Im Hinblick auf solche Anwendungen ist es wichtig, eine Palette von verschiedenen Esterasen mit
30 unterschiedlichen Spezifitäten verfügbar zu haben. Weiters sollen diese Enzyme in ausreichenden Mengen und zu ökonomisch vertretbaren Preisen am Markt vorhanden sein. So sind derzeit technische Anwendungen von Verfahren, die auf der Basis von teuren und nur in kleineren Mengen verfügbaren Enzymen (wie z.B. Schweineleber-Esterase) entwickelt wurden, nicht realisierbar.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, eine neue Esterase, die z.B. für spezifische
35 organische Umsetzungen einsetzbar ist, zur Verfügung zu stellen. Diese Aufgabe wurde gelöst, indem das entsprechende Gen kloniert wurde. Dieser Weg erlaubte nicht nur die effiziente Identifizierung der neuen Esterase, es ist mit der Verfügbarkeit des Strukturgens auch die Möglichkeit einer ökonomischen Produktion in großen Mengen durch gentechnische Strategien gegeben. Unter Verwendung von bereits zum Teil entwickelter Expressions- und Sekretionssysteme ist die Überexpression des Gens in geeigneten Wirtsorganismen, vor allem Bakterien, Hefen oder filamentösen Pilzen, realisierbar. Wesentliche Grundlagen zur
40 Expression von homologen und heterologen Genen in Bakterien, Hefen und filamentösen Pilzen finden sich z.B. in: Goeddel, D.V. (ed.), Methods in Enzymology, Vol. 185, Gene Expression Technology, Academic Press, San Diego, 1990; und Harris, T.J. (ed.), Protein production by Biotechnology. Elsevier, Amsterdam, 1989.

45 Die vorliegende Erfindung betrifft somit eine neue Esterase, die der zugrundeliegenden Aufgabenstellung entspricht. Die vorliegende Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt eine DNA, die für die Esterase kodiert. Deren Sequenz entspricht dem aus dem Bakterium *Pseudomonas marginata* ATCC 10248 (ATCC = American Type Culture Collection) isolierten DNA-Fragment, das auf dem aus der Genbank von *P.marginata* ATCC 10248 isolierten rekombinanten Plasmid pGSP10 enthalten ist. Das Bakterium *Pseudo-*
50 *monas marginata* wurde allgemein als Lipase/Esterasebildner (Hydrolyse von Tween 80) beschrieben (Krieg und Holt, eds, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1, Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A., 1984). Das in pGSP10 enthaltene *P.marginata*-DNA-Fragment hat eine Größe von ca. 5,2 Kilobasenpaaren (kb) und konnte durch Subklonierungen auf eine Größe von 1.826 bp reduziert werden, ohne daß dabei die Expression des Esterasegens beeinträchtigt wurde. Dieses DNA-Fragment wurde sequenziert.
55 Aus der Analyse der DNA-Sequenz konnte ein offener Leserahmen für ein Polypeptid von 38,3 Kilodalton (kDa) gefunden werden. In Experimenten zur Detektion von kodierten Polypeptiden nach dem "Maxicell"-Prinzip (Stoker et al., In vivo gene expression systems in prokaryotes, in: Hames, B.D. und Higgins, S.J. (eds.) Transcription and Translation, IRL Press, Oxford, 1984, pp. 153-177) konnte ein Protein etwa dieser

Größe nachgewiesen werden. Diese Esterase wurde als "Esterase EP10" bezeichnet und ist durch die aus der Nukleinsäuresequenz abgeleitete Aminosäuresequenz determiniert. Der zugehörige genetische Locus wurde mit "estA" festgelegt. Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt eventuelle cotranslationale bzw. posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Abspaltung des N-terminalen Methionins, die für einige Proteine beschrieben wurden (z.B. SSB-Protein von *E.coli*; Meyer und Lane, Microbiol. Rev., 54:342-380, 1990). Aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz kann auf eine mögliche Signalsequenz geschlossen werden. Hinweise auf eine mögliche Prozessierung des postulierten Signalpeptids ergeben sich aus den "Maxicell"-Experimenten. Diese zeigen, wie in Beispiel 4 beschrieben, daß bei Analyse des subklonierten DNA-Fragmentes, zwei Polypeptide mit unterschiedlichen Molekulargewichten detektiert werden können, die auf eine prozessierte und eine unprozessierte Form der Esterase EP10 schließen lassen.

In den im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Versuchen, wurde die Herstellung der Esterase durch Einbau des 1.826 bp *estA* Fragments in einen Expressionsvektor für *E.coli* und durch Überexpression dieses Gens in *E.coli* realisiert. Das *estA*-Gen kann bei Verwendung entsprechender Expressionsvektoren auch in einer Reihe von anderen Mikroorganismen überexprimiert werden. Beispiele für geeignete Wirtsorganismen sind *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* und andere. So konnten z.B. das bakterielle Levanase-Gen (aus *Bacillus subtilis*) in *Saccharomyces cerevisiae* unter der Kontrolle eines Hefepromotors (Wanker et al., J. Biotechnol. 18:243-254, 1991) oder das bakterielle β -Galaktosidase-Gen (aus *E. coli*) in filamentösen Pilzen wie *Aspergillus nidulans* (Van Gorcom et al., Gene, 40:99-106, 1985), *Penicillium chrysogenum* (Kolar et al., Gene, 62:127-134, 1988) und *Aspergillus oryzae* (De Ruiter-Jacobs et al., Current Genetics, 16:159-163, 1989), eine bakterielle Endoglucanase in *Aspergillus nidulans* (Gwynne et al., Biotechnology, 5:713-719, 1987, oder eine bakterielle Glucuronidase in *Aspergillus niger* (Punt et al., J. Biotechnol. 17:19-34, 1991) erfolgreich exprimiert werden. Das *estA* Gen kann auch in dem Stamm *P.marginata*, aus dem das Gen isoliert wurde, oder in Mutanten davon, oder in anderen geeigneten bakteriellen Stämmen überexprimiert werden. Eine solche Strategie wurde z.B. zur Expression eines lipolytischen Enzyms durchgeführt (EP-A 0 334 462). Die heterologe Expression von bakteriellen Genen in fremden Bakterienstämmen ist bereits für viele Gene beschrieben worden. Zum Beispiel konnte das aus *E. coli* (Gram-negativ) klonierte β -Lactamase Gen im Gram-positiven Bakterium *Bacillus subtilis* exprimiert und sekretiert werden (Palva et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79:5582-5586, 1982).

Die erfindungsgemäße Esterase EP10 ist in der Lage, eine große Anzahl verschiedener Carboxylester zu hydrolysieren. Unter anderem können Triglyceride mit Fettsäureresten bis zu einer Kettenlänge von 10 C-Atomen gespalten werden. Weiters konnte Hydrolyseaktivität gegen ortho- und para-Nitrophenylester bei denen die Fettsäurekomponente Kettenlängen bis zu 12 C-Atomen aufweisen kann, gefunden werden.

Besonders nützlich erweist sich die erfindungsgemäße Esterasepräparation zur schonenden und gegebenenfalls enantioselektiven Hydrolyse von Estern von Carbonsäuren mit ein bis zehn Kohlenstoffatomen mit sekundären Alkoholen der allgemeinen Struktur $R^1\text{-CHOH-R}^2$, wobei R^1 von R^2 verschieden ist und beide für einen verzweigten oder unverzweigten Alkylrest mit ein bis zehn Kohlenstoffatomen stehen, der auch Doppel- oder Dreifachbindungen als Strukturmerkmale aufweisen kann. Als Substituenten für R^1 und R^2 sind ein oder mehrere Halogenatome wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod, oder Hydroxygruppen, die mit Aldehyden oder Ketonen bis maximal sechs Kohlenstoffatomen acetalisiert werden können, oder Alkoxygruppen mit ein bis vier C-Atomen, Benzyloxygruppen, Amino- bzw. N-Acylaminogruppen mit zwei bis sieben Kohlenstoffatomen und ein Phenylring oder Naphthylring möglich, der als Substituenten ein oder mehrere Hydroxygruppen oder Halogenatome wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod, Alkoxygruppen mit ein bis vier Kohlenstoffatomen, Benzyloxygruppen oder N-Acylaminogruppen mit zwei bis sieben Kohlenstoffatomen tragen kann. Die bevorzugte Hydrolyse eines Enantiomeren aus einem racemischen Ester eines sekundären Alkohols mittels Esterasen ist zwar prinzipiell bekannt, wie dies in dem Buch "Biotransformations in Preparative Organic Chemistry", Academic Press, 1989, auf den Seiten 32-51 beschrieben ist, die erzielten Enantiomerenüberschüsse sind jedoch unbefriedigend und es ist die Esterase nur in unreiner bzw. nicht definierter Form zugänglich, wobei die Gewinnung größerer Mengen schwierig sein kann, während das erfindungsgemäße Verfahren die Produktion eines genau charakterisierten Enzyms gestattet.

Weitere Substrate, die mittels der erfindungsgemäßen Esterasepräparation vorteilhaft verseift werden, sind Ester von Carbonsäuren mit ein bis zehn Kohlenstoffatomen mit bicyclischen Alkoholen mit beispielsweise Bicyclo[2.1.1]hexan-, Bicyclo[2.2.1]heptan- und Bicyclo[2.2.2]octan- oder [3.2.1]octanstruktur, die eine Doppelbindung aufweisen können und als weitere Substituenten ein oder mehrere Halogenatome wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod oder Hydroxygruppen, die mit Aldehyden oder Ketonen bis maximal sechs Kohlenstoffatomen acetalisiert sein können, Alkoxygruppen mit ein bis vier Kohlenstoffatomen, Benzyloxygruppen, Amino- oder N-Acylaminogruppen mit zwei bis sieben Kohlenstoffatomen und einen Phenylring oder Naphthalinring tragen können, der als Substituenten eine oder mehrere Hydroxygruppen oder

Halogenatome wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod, Älkoxygruppen mit ein bis vier Kohlenstoffatomen, Benzylxygruppen oder N-Acylaminogruppen mit zwei bis sieben Kohlenstoffatomen tragen kann.

Als weitere Substrate sind Ester von Carbonsäuren mit ein bis zehn Kohlenstoffatomen mit cis-Cycloalkandimethanolen der allgemeinen Formel

5

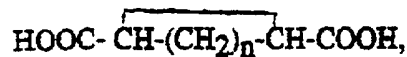


70 zu nennen, wobei n für eine Zahl von eins bis sechs steht, die gegebenenfalls eine Doppelbindung enthalten und als weitere Substituenten ein oder mehrere Hydroxylgruppen tragen, die mit Alkoholen mit ein bis sieben Kohlenstoffatomen verethert sein können sowie auch als Acetale mit Aldehyden bzw. Ketonen mit maximal insgesamt sechs Kohlenstoffatomen vorliegen können. Sofern diese Hydrolyse die Überföhrung einer meso-Form in eine chirale Verbindung bedeutet, wird hierbei gegebenenfalls eines der enantiomeren Produkte bevorzugt gebildet.

15

Weitere mögliche Substrate sind Ester von Carbonsäuren der allgemeinen Formel

20



wobei n für eine Zahl von eins bis sechs steht, mit Alkoholen mit maximal acht Kohlenstoffatomen, wobei der Cycloalkanring gegebenenfalls eine Doppelbindung enthalten und als weitere Substituenten ein oder mehrere Hydroxylgruppen tragen kann, die mit Alkoholen mit ein bis sieben Kohlenstoffatomen verethert sein können sowie auch als Acetale mit Aldehyden bzw. Ketonen mit maximal insgesamt sechs Kohlenstoffatomen vorliegen können. Sofern diese Hydrolyse die Überföhrung einer meso-Form in eine chirale Verbindung bedeutet, wird hierbei gegebenenfalls eines der Enantiomeren bevorzugt gebildet.

25

Die enzymkatalysierte Reaktion kann auch als Umesterung geföhrt werden, indem man einen der vorstehend genannten Alkohole in einem Enolester wie Vinylacetat oder Isopropenylacetat umsetzt.

30

Alle genannten Produkte stellen wichtige Bausteine für die chemische Synthese dar.

Beispiel 1

Herstellen einer genomischen Genbank von *Pseudomonas marginata* ATCC 10248

35

Der Stamm *Pseudomonas marginata* ATCC 10248 zeigte bei einem Plattentest mit Tributyrin nach Oterholm und Ordal (Journal of Dairy Science, 49:1281-1284, 1966) sehr gute Hydrolyseaktivität. Gesamt-DNA dieses Stammes wurde nach der Methode von Saito und Miura (Biochim. Biophys. Acta, 72:619-629, 1963) aus Zellen, die in LB-Medium (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) für 16 Stunden bei 40 30°C angezüchtet wurden, isoliert. Nach partiellem Verdau dieser DNA mit der Restriktionsendonuklease *Sau3A* (Boehringer Mannheim) wurden Fragmente des Größenbereichs um 10 kb über Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und mit *Bam*HI geschnittener, dephosphorylierter DNA des Plasmids pGEM-3Zf(+) (Promega, Madison, WI, U.S.A) ligiert. Nach Transformation der Ligationsprodukte in 45 *Escherichia coli* HB101 (ATCC 33649) konnte eine Genbank mit ca. 11.300 unabhängigen Klonen mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 9 kb erhalten werden. Die Arbeiten zur Herstellung der Genbank wurden nach Standardmethoden der Gentechnik (Maniatis et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A., 1982) durchgeführt.

Beispiel 2

50

Isolierung eines Plasmids, das ein Esterase-exprimierendes DNA-Fragment aus *P.marginata* ATCC 10248 enthält

55

Klone der Genbank wurden auf Agarplatten (LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin-Na-Salz) ausplattiert, sodaß nach Bebrütung bei 37°C für 18 h Einzelkolonien erhalten wurden. Die Kolonien wurden auf LB-Agarplatten mit 7 g/l Tributyrin und 100 mg/l Ampicillin repliziert. Nach 4-tägiger Inkubation bei 37°C konnten einige Klone identifiziert werden, die einen aufgehellten Hof um die jeweils angewachsene Kolonie zeigten. Aus zwei ausgewählten Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert (Birnboim und Doly, Nucleic Acids

Research, 7:1513-1523, 1979), mit verschiedensten Restriktionsendonukleasen (*Hind*III, *Sac*I, *Nco*I, *Xba*I, *Sma*I, *Kpn*I und *Mlu*I) geschnitten und die Insertgröße bestimmt sowie Restriktionskarten erstellt. Die zwei aus diesen Klonen isolierten Plasmide wurden pGSP10 (Insertgröße ca. 5,2 kb) und pGSP11 (Insertgröße ca. 8,4 kb) genannt. Restriktionskarten dieser Plasmide sind in Figur 1 gezeigt. Dabei sind die Vektoranteile durch dünne Linien dargestellt. Die schwarzen und schattierten Segmente repräsentieren klonierte DNA aus *P. marginata*, wobei die schwarzen Segmente für die Esterase-Aktivität essentielle Bereiche darstellen. Aus der Lage der Restriktionsschnitte konnte ersehen werden, daß beide Plasmide zum Teil gleiche Fragmente aufwiesen. Mit Hilfe von DNA-DNA Hybridisierungsexperimenten (Southern, J. Mol. Biol., 98:503-507, 1975), bei denen mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnittene DNA eines Plasmids mit DNA des jeweiligen anderen Plasmids als Probe hybridisiert wurde, konnten homologe Bereiche auf beiden Plasmiden nachgewiesen werden. Simultan dazu wurde bei diesen Experimenten auch chromosomale DNA von *P. marginata* ATCC 10248, geschnitten mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI, auf das Vorhandensein von zu den Inserts in den Plasmiden pGSP10 und pGSP11 homologen Bereichen untersucht. Dabei konnte verifiziert werden, daß die klonierten Inserts in pGSP10 und pGSP11 aus *P. marginata* stammen. Weiters konnte durch Deletion der beiden *Sac*I-*Sac*I Fragmente von pGSP10 bzw. der beiden *Mlu*I-*Mlu*I Fragmente und des angrenzenden *Mlu*I-*Hind*III Fragments von pGSP11 gezeigt werden, daß die genetische Information für die Esterase in den auf den Plasmiden pGSP10 und pGSP11 gemeinsam vorhandenen DNA-Abschnitten lokalisiert ist. Aufgrund der Tatsache, daß pGSP10 und pGSP11 das gleiche, für Esterase kodierende DNA-Fragment enthalten, wurde in weiterer Folge nur mehr mit dem Plasmid pGSP10 weitergearbeitet.

Beispiel 3

Eingrenzung des minimal notwendigen DNA-Bereichs zur Expression einer funktionellen Esterase

Das Plasmid pGSP10 enthält ein ca. 5,2 kb großes DNA-Insert aus *P. marginata* ATCC 10248. Basierend auf den kartierten Restriktionsschnittstellen wurden Deletions- und Subklonierexperimente unter Verwendung von Standardmethoden (Maniatis et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A., 1982) durchgeführt. Zur Subklonierung wurde der Vektor pGEM-7Zf(+) (Promega, Madison, WI, U.S.A.) verwendet. Alle entstandenen Plasmide wurden in *E. coli* HB101 transformiert und die entsprechenden Transformanten auf LB-Agar mit 7 g/l Tributyrin und 100 mg/l Ampicillin auf Esteraseaktivität getestet. Aus diesen Experimenten konnte letztlich ein Plasmid erhalten werden, daß nur mehr ein etwa 1,8 kb großes DNA-Fragment aus *P. marginata* enthält und *E. coli* HB101 einen Esterase-positiven Phänotyp verleiht. Dieses Plasmid wurde pGSP10Δ0 genannt. Das in pGSP10Δ0 enthaltene DNA-Fragment wurde noch über *Xba*I-*Sac*I aus dem Plasmid pGSP10 ausgeschnitten, die Enden wurden mit DNA-Polymerase I Klenow-Fragment und dNTP aufgefüllt und anschließend über "blunt-end" Ligation in *Sma*I geschnittene, dephosphorylierte DNA des Plasmids pGEM-7Zf(+) eingebaut. Das resultierende Plasmid (pGSP10AΔ0) vermittelt nach Transformation in *E. coli* HB101 ebenfalls Esterase-positiven Phänotyp. Restriktionskarten dieser beiden Plasmide sind in Figur 2 gezeigt, wobei das schwarze Segment den für die Esterase kodierenden Bereich repräsentiert. Die in Figur 2 benutzten Abkürzungen bedeuten: f1, Replikationsursprung des Phagen f1; bla, β-Laktamase Gen; Ori, Replikationsursprung des Vektors; lacZ, zur α-Komplementation befähigtes Fragment des *E. coli lacZ* Gens. Ausgehend von diesen beiden Plasmiden (pGSP10Δ0 und pGSP10AΔ0) wurde das 1,8 kb DNA-Fragment von beiden Seiten mit Hilfe von Exonuklease III-Nuklease S1 schrittweise verkürzt (Henikoff, S., Gene, 28:351-359, 1984). Dazu wurde ein Reagentienkit der Fa. Promega (Erase-a-Base System, Katalog Nr. E5750) unter Einhaltung der beigefügten Arbeitsvorschrift verwendet. Das Plasmid pGSP10Δ0 wurde vorher mit *Kpn*I und *Hind*III vollständig geschnitten. Nach dem Verdau mit Exonuklease III-Nuklease S1 wurde zur Rezirkularisierung eine "blunt-end" Ligation durchgeführt und die DNA in *E. coli* HB101 transformiert. Aus erhaltenen Transformanten (selektioniert auf LB-Agar mit 100 mg/l Ampicillin) wurde Plasmid DNA isoliert (Birboim und Doly, Nucleic Acids Res., 7:1513-1523, 1979) und mit Restriktionsschnitten und Agarosegelelektrophorese (0,7%) die Größe des jeweils enthaltenen Inserts ermittelt. Zur Erzeugung von fortschreitenden Deletionen am anderen Ende des Fragments wurde das Plasmid pGSP10AΔ0 mit den Restriktionsendonukleasen *Sac*I und *Hind*III geschnitten. In diesem Fall wurden nach dem Exonuklease III-Nuklease S1 Verdau und Erzeugung von "blunt-ends" mit Klenow-Fragment phosphorylierte *Sac*I-Linker (8-mer Oligonukleotid, 5'CGAGCTCG 3') im Zuge der Rezirkularisierung durch Ligation eingebaut. Die entstandenen Deletionsklone wurden dann durch Restriktionsanalyse charakterisiert. Es wurden auf diese Weise insgesamt 23 Deletionsklone mit unterschiedlich fortschreitenden Deletionen erhalten. Zusätzlich wurden unter Benutzung bereits bekannter Restriktionsschnittstellen zwei weitere Deletionsklone konstruiert, um eine bessere Abstufung zu erhalten. Alle Klone wurden anschließend auf LB-

Agar mit 7 g/l Tributyrin und 100 mg/l Ampicillin auf Esterase-Aktivität untersucht. Mit diesen Daten konnte der für die Esterase essentielle DNA-Bereich auf etwa 1,37 kb eingegrenzt werden. Eine Zusammenstellung der Deletionsgrenzen in den einzelnen Klonen ist in Figur 3 gezeigt. Die Pfeile geben dabei die Orientierung für die Sequenzierung an. Die mit unterbrochenen Pfeilen dargestellten Derivate wurden durch Konstruktion mittels vorhandener Restriktionsschnittstellen erhalten. Die Esteraseaktivität der einzelnen Klone (Tributyrin-Plattenassay) ist mit +/- bei den einzelnen Klonen angeführt. Die unterhalb aufgelisteten Zahlen geben die Lage der Deletionsendpunkte in Basenpaaren (bp) bezüglich der in Figur 5 gezeigten Nukleotidsequenz an.

Beispiel 4

Identifizierung von kodierten Polypeptiden auf dem 1,8 kb Fragment von pGSP10Δ0 und Feststellung der Transkriptionsrichtung für die Expression der Esterase

Zur Identifizierung von kodierten Polypeptiden wurde das Maxicell-System (Stoker et al., In vivo Gene Expression Systems in Prokaryotes, in: Hames und Higgins, eds. Transcription and Translation, IRL Press, Oxford, 1984, pp. 153-177) eingesetzt. Dazu wurde das Plasmid pGSP10Δ0 in den Stamm *E.coli* CSR603 transformiert. Die Durchführung erfolgte wie bei Stoker et al. (siehe oben) beschrieben. Die Markierung von synthetisierten Polypeptiden erfolgte mit ³⁵S-Methionin (Amersham, UK). Die Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (12 % Acrylamid) und anschließender Fluorographie analysiert (Apparatur "Mini-Protean II", Fa. Biorad). Zur Kontrolle wurden der plasmidfreie Stamm *E.coli* CSR603 sowie Transformanten mit dem leeren Vektor pGEM-7Zf(+) eingesetzt. Bei diesen Experimenten konnten zwei für das Plasmid pGSP10 Δ0 spezifische Polypeptide mit Molekulargewichten von ca. 40 kDa und ca. 37 kDa identifiziert werden.

Zur Feststellung der Transkriptionsrichtung wurde das für die Esterase kodierende ca. 1,8 kb DNA-Fragment als *SacI-HindIII* Fragment aus pGSP10 ausgeschnitten und in die Expressionsvektoren pJF119EH und pJF119HE (Fürste et al., Gene 48:119-131, 1986) einkloniert. Die resultierenden Plasmide pGSP10EH und pGSP10HE sind in Figur 4 schematisch dargestellt. Das starke schwarze Segment stellt jeweils den für die Esterase kodierenden Bereich dar. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an, die folgenden Abkürzungen bedeuten: P_{lac}, *fac*-Promoter; *rrnB*, Terminator; *lacIq*, Gen für Lac-Repressor; Ori, Replikationsursprung; *bla*, β-Laktamase Gen.

Die Plasmide pGSP10EH und pGSP10HE wurden in *E.coli* HB101 transformiert und die erhaltenen Transformanten auf Esteraseaktivität getestet. Dazu wurden die Stämme auf LB-Agar mit 7 g/l Tributyrin und 100 mg/l Ampicillin, sowie auf den gleichen Medien mit zusätzlich 1 mM Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) ausgestrichen, und die Bildung von Aufklärungshöfen nach Inkubation der Platten bei 37°C für 40 Stunden untersucht. Dabei zeigte sich, daß nur die Klone mit pGSP10HE bei Induktion mit IPTG Esterase-Aktivität aufwiesen. Somit konnte die Orientierung des Esterase-Gens zum induzierbaren *fac*-Promoter, wie in Figur 4 eingezeichnet, festgelegt werden.

Beispiel 5

Sequenzierung des Esterase-Gens aus *Pseudomonas marginata* ATCC 10248

Die Nukleotidsequenz des gesamten im Plasmid pGSP10Δ0 enthaltenen, ca. 1,8 kb großen DNA-Fragments aus *P.marginata* wurde nach der Methode von Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74:5463-5467, 1977) ermittelt. Als Basis dienten die in Beispiel 3 angeführten Deletionsklone. Dabei wurde sowohl Doppelstrang-DNA als auch Einzelstrang-DNA als Vorlage benutzt. Zur Durchführung der Sequenzreaktionen wurden Reagentiensysteme mit T7-DNA Polymerase (Promega) und *Taq*-DNA Polymerase (Promega oder Boehringer Mannheim) verwendet. Es wurden die M13/pUC Universalprimer (Reverse und Forward) verwendet. Die Markierung erfolgte mit α³⁵S-dATP (Amersham, UK). Die Sequenzreaktionen wurden entsprechend den Angaben der Herstellerfirmen durchgeführt. Zur Auflösung von ausgeprägten Sekundärstrukturen wurde teilweise 7-deaza-dGTP anstelle von dGTP verwendet und die Sequenzreaktionen teilweise bei höheren Temperaturen durchgeführt. Für die Herstellung der denaturierenden (Harnstoff) Polyacrylamid-Gele und die Durchführung der Elektrophorese wurde das "Macrophor" System der Fa. LKB (Schweden) verwendet. Die Sequenzgele wurden nach dem Trocknen auf Hyperfilm MP (Amersham, UK) für 24 - 72 h bei Raumtemperatur exponiert. Die aus den Autoradiogrammen erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem "Gene Master" System (Biorad, U.S.A.) aufgearbeitet. Die gesamte Nukleotidsequenz des in pGSP10Δ0 enthaltenen DNA-Fragments ist in Figur 5 gezeigt. Eine mögliche Ribosomenbindestelle (S/D) ist unterstrichen, der postulierte Translationsstart (ATG) und der Translationsstopp (TAA) sind eingerahmt.

Eine Repeatstruktur, die für die Termination der Transkription in Frage kommen könnte, ist mit Pfeilen unterhalb der Sequenz gekennzeichnet.

Eine Analyse dieser Sequenz ergab einen offenen Leserahmen für das *estA* Gen in der ermittelten Transkriptionsrichtung, beginnend mit einem ATG bei Position 329 und endend mit einem TAA-Stoppkodon bei Position 1466. Dieser Leserahmen kodiert somit für ein Peptid von 379 Aminosäuren. Das errechnete Molekulargewicht für das gesamte EstA-Peptid beträgt ca. 38,3 kDa. Die aus der ermittelten DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz für das Genprodukt des *estA* Gens, der Esterase EP10, ist ebenfalls in Figur 5 gezeigt.

Die Analyse der Peptidsequenz der Esterase EP10 hinsichtlich einer möglichen Signalsequenz ergab entsprechend den Kriterien von Von Heijne (J. Mol. Biol., 184:99-105, 1985; Nucleic Acids Res., 14:4683-4690, 1986;) eine gute Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer Signalsequenz am N-Terminus des EstA-Peptids. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Figur 6 gezeigt. Die potentielle h-Region ist unterstrichen, mögliche Spaltstellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Zeichen über den Aminosäuren bedeuten: h, hydrophob; p, polar; +, positiv geladen; -, negativ geladen.

Eine Abspaltung des Signalpeptids an einer der beiden möglichen Spaltstellen würde ein um etwa 3 - 3,6 kDa verkürztes Protein ergeben. In den Maxicellexperimenten (Beispiel 4) wurden zwei Polypeptide mit einer Größe von ca. 40 kDa bzw. 37 kDa aufgefunden. Dies korreliert sehr gut mit den berechneten Größen für das unprozessierte und das prozessierte EstA-Polypeptid.

20 Beispiel 6

Herstellung von Esterase EP10 Präparationen durch Überexpression des *estA* Gens in *Escherichia coli*

Das in Beispiel 4 beschriebene Plasmid pGSP10HE, bei dem das *estA* Gen von *P.marginata* unter der Kontrolle des induzierbaren *tac*-Promotors steht, wurde in *E.coli* HB101 transformiert. Eine entsprechende Transformante wurde nach Verifizierung für Expressionsexperimente verwendet. Es wurden verschiedene Medien, Induktorkonzentrationen und Induktionszeiten verwendet. Die Zellen wurden nach Anzucht in Schüttelkulturen (100 ml) bei 37°C und 160 Upm jeweils nach Ende der entsprechenden Inkubations- und Induktionszeit durch Zentrifugation geerntet, in jeweils 1 ml 100 mM Tris-HCl, pH 7,0 aufsuspendiert und mit einem Ultraschalldesintegrator (Labsonic 2000, Fa. Braun oder 250 Sonifier, Fa. Branson) unter Eiskühlung aufgeschlossen. Die Aktivität an Esterase EP10 wurde mit einem photometrischen Test unter Verwendung von *o*-Nitrophenylbutyrat als Testsubstrat (siehe Beispiel 7) ermittelt.

Eine Zusammenstellung der bei diesen Versuchen eingesetzten Bedingungen und der erhaltenen Ergebnisse ist in den Tabellen 1-3 zusammengestellt.

35

40

45

50

55

Tabelle 1

Bedingungen	Expressionsversuche mit verschiedenen Medien und variierenden Induktorkonzentrationen			Gesamtprotein (mg)	spezifische Aktivität (mU/mg Protein)	gesamte Einheiten U/Ansatz
	OD ₅₀₀		bei Ernte			
	vor Induktion					
M9/Glukose	0,54	0,62	5,7	25,6	0,1	
M9/Glycerin	0,34	0,42	4,4	58,1	0,3	
M9/Fruktose	0,44	0,47	6,6	16,0	0,1	
M9/Glukose/HE	2,54	3,01	31	18,5	0,6	
M9/Glukose/HE/NH ₄ /SO ₄	2,49	2,78	35	18,2	0,6	
M9/Glukose/HE/CS	2,70	2,87	31	64,1	2,0	
M9/Glukose/HE/CS*	2,67	3,01	62	107	6,6	

Die Induktion wurde mit 1 mM IPTG bzw 0,5 mM IPTG (*) in der späten exponentiellen Wachstumsphase für 1 Stunde bzw. 2 Stunden (*) durchgeführt. Die Versuche wurden mit M9 Medium mit der angegebenen C-Quelle (jeweils 10 g/l), supplementiert mit 2 ml Spurenelementlösung SL-6 und 100 mg/l Ampicillin durchgeführt. Zusätze wurden wie angegeben in folgenden Konzentrationen beigelegt: 5 g/l Hefeextrakt (HE), 5 g/l Casaminoacids (CS), 4 g/l Ammoniumsulfat (NH₄), 0,8 g/l Magnesiumsulfat (SO₄).

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

Tabelle 2

Expressionsversuche mit varierenden Induktorkonzentrationen und Induktionszeiten.						
Bedingungen		OD ₅₀₀		Gesamtprotein (mg)	spezifische Aktivität (mU/mg Protein)	gesamte Einheiten U/Ansatz
Induktorkonzentration	Induktionszeit	vor Induktion	bei Ernte			
0,5 mM	1 h	2,64	3,24	97	151	14,7
0,5 mM	2 h	2,46	3,33	106	179	20,0
0,5 mM	4 h	2,55	3,97	110	184	20,2
0,05 mM	1 h	2,32	3,09	92	145	13,3
0,05 mM	2 h	2,35	3,56	98	185	18,1
0,05 mM	4 h	2,37	3,68	106	189	20,0
0,005 mM	1 h	2,45	3,07	97	46,0	4,5
0,005 mM	2 h	2,73	3,36	108	50,9	5,5
0,005 mM	4 h	2,38	3,60	114	58,8	6,7

Die Versuche wurden mit Glukose(10 g/l)-M9 Medium, supplementiert mit 2 ml Spurenelementlösung SL-6 und 100 mg/l Ampicillin durchgeführt. Zusätzlich wurden 5 g/l Hefeextrakt (HE) und 5 g/l Casaminoäuren (CS) beigefügt: Die Induktion wurde mit der angegebenen Konzentration an IPTG in der späten exponentiellen Wachstumsphase für den angegebenen Zeitraum durchgeführt.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

Tabelle 3

Bedingungen		OD ₅₀₀		Gesamtprotein (mg)	spezifische Aktivität (mU/mg Protein)	gesamte Einheiten U/Ansatz
Wachstumsphase	Induktionszeit	vor Induktion	bei Ernte			
mittl.exp.	4 h	0,5	2,19	83	129	10,7
mittl.exp.	8 h	0,5	3,37	119	184	21,9
mittl.exp.	über Nacht	0,5	3,19	74	255	18,9
spät exp.	4 h	2,16	3,43	110	250	27,5
spät exp.	8 h	2,04	4,12	117	245	28,7
spät exp.	über Nacht	1,73	3,81	131	147	19,3
exp.-stat.	4 h	3,77	5,04	121	134	16,2
exp.-stat.	8 h	3,84	5,13	128	107	13,7
exp.-stat.	über Nacht	3,68	4,71	119	98	11,4

Die Versuche wurden mit Glukose(10 g/l)-M9 Medium, supplementiert mit 2 ml Spurenelementlösung SL-6 und 100 mg/l Ampicillin durchgeführt. Zusätzlich wurden 5 g/l Hefeextrakt (HE) und 5 g/l Casaminsäuren (CS) beigefügt: Die Induktion wurde mit 0,05 mM IPTG in der angegebenen (mittl.exp., mittlere exponentielle; spät exp., späte exponentielle; exp.-stat., Übergang exponentielle zu stationärer) Wachstumsphase für den angegebenen Zeitraum durchgeführt.

Aus diesen Ergebnissen kann ersehen werden, daß die Aktivität (Gesamtaktivität und spezifische Aktivität) an Esterase EP10 in den Zellysaten durch geeignete Maßnahmen beträchtlich erhöht werden kann.

- 5 Entsprechend diesen Ergebnissen können Esterase EP10 Enzympräparationen mit hohen Aktivitäten routinemäßig nach bereits bekannten Methoden, aber auch folgendermaßen hergestellt werden: Zellen von *E.coli* HB101 (pGSP10HE) werden in M9-Medium (Miller, Experiments in Molecular Genetics, CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972) mit Glukose (10 g/l), Hefeextrakt (5 g/l), Casamino-säuren (Difco, 5 g/l) und 2 ml/l Spurenelementelösung SL-6 (Pfennig und Lippert, Arch. Mikrobiol., 55:245-256, 1966) sowie Ampicillin-Na Salz (100 mg/ml) bei 37°C bis zur späten exponentiellen Phase angezüchtet. Anschlie-
 10 bend wird IPTG (0,05 mM) zugesetzt und die Kultur für weitere 4 h unter denselben Bedingungen weiter inkubiert. Die Zellen werden anschließend durch Zentrifugation geerntet, in 100 mM Tris-HCl, pH 7,0 aufsuspendiert (1 ml pro 100 ml ursprüngliches Kulturvolumen) und mit Ultraschall für 15 s bei ca. 90 Watt (250 Sonifier, Branson) unter Eiskühlung aufgeschlossen. Das auf diese Weise hergestellte Zellysat kann
 15 direkt als Enzympräparation eingesetzt werden. Dieses Lysat kann auch getrocknet werden (z.B. durch Lyophilisation oder Sprühtrocknung). Im Falle der Trocknung durch Lyophilisation wurde festgestellt, daß praktisch kein Aktivitätsverlust auftritt. Die Lagerung von flüssigen und getrockneten Enzympräparationen kann problemlos durch Einfrieren, etwa bei minus 20°C, erfolgen.
- Diese in den Tabellen 1-3 zusammengefaßten Experimente stellen eher orientierende Versuche dar. Es ist
 20 durchaus denkbar, durch weitere Optimierungen der Medien, der Züchtungsbedingungen und der Induktionsbedingungen entsprechend allgemein üblicher Strategien weitere beträchtliche Steigerungen in der Menge bzw. Aktivität an Esterase EP10 in Zellysaten zu erzielen. Für die technische Produktion von Enzympräparationen mit Esterase EP10 Aktivität mit *E.coli* Wirtssystemen ist der Einsatz von weiteren Expressionsvektoren auf der Basis anderer Promotoren (Balbas und Bolivar, Design and Construction of
 25 Expression Plasmid Vectors in Escherichia coli, in: Goeddel, ed., Gene Expression Technology, Methods in Enzymology, Vol 185, Academic Press, San Diego, CA, New York, 1990) eventuell vorteilhafter. Auch die Verwendung anderer *E.coli* Wirtstämme kann bessere Ergebnisse bringen.
- Auf die mögliche Verwendung anderer Organismen als Wirte zur Produktion der Esterase EP10 wurde bereits hingewiesen.

30

Beispiel 7

Hydrolyse von Nitrophenyl-Carbonsäureestern mit Esterase EP10 Präparationen

- 35 Zur Feststellung von Präferenzen hinsichtlich der Hydrolyse verschiedener Nitrophenylester Verbindungen wurden ortho- und para-Nitrophenylester mit Carbonsäuren unterschiedlicher Kettenlänge mit Esterase EP10 Präparationen (siehe Beispiel 6) versetzt. Dazu wurde folgender Testansatz (1 ml Gesamtvolumen) durchgeführt (in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke):
- Unverdünntes oder entsprechend verdünntes Esterase EP10 - aktives Zellysat (1 - 20 Mikroliter) wurden in
 40 100 mM Tris-HCl, pH 7,0 vorgelegt. Das Substrat (Stammlösung in Ethanol) wurde jeweils zu einer Endkonzentration von 4 mM zugesetzt (maximal 100 Mikroliter). Der Ansatz wurde bei 30°C inkubiert und die Extinktionszunahme pro Zeiteinheit bei 420 nm ermittelt. Basierend auf den molaren Extinktionskoeffizienten für ortho-Nitrophenol (1,26 ml/mMol/cm) oder para-Nitrophenol (3,89 ml/mMol/cm) konnten die Enzymaktivitäten hinsichtlich der verschiedenen Substrate bestimmt werden. 1 Unit entspricht dabei jener
 45 Esteraseaktivität, bei der pro Minute 1 mMol ortho- bzw. para-Nitrophenol freigesetzt wird. Die mit verschiedenen o-Nitrophenyl- und p-Nitrophenyl-Carbonsäureestern erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

50

55

Tabelle 4

Hydrolyse von ortho- und para-Nitrophenylestern, deren Fettsäurekomponenten verschiedene Kettenlängen aufweisen, mit Esterase EP10.						
Säuregruppe	ortho-Nitrophenylester			para-Nitrophenylester		
	spezifische (mU/mg Protein)	Aktivität	relative %	spezifische (mU/mg Protein)	Aktivität	relative %
C2	82		18,2	2940		70,3
C3	450		100	4180		100
C4	84		18,7	3310		79,2
C5	41		9,1	2354		56,3
C6	43		9,6	3270		78,2
C8	6		1,3	113		2,7
C10	n.n.		n.n.	23		0,6
C12	n.n.		n.n.	n.n.		n.n.

1 Unit entspricht jener Enzymaktivität, bei der 1 μ mol ortho- bzw. para-Nitrophenol durch Hydrolyse freigesetzt wird. Die relative Aktivität (%) bezieht sich auf den jeweils größten Wert, der innerhalb einer bestimmten Derivatreihe (ortho bzw. para) ermittelt wurde. Die bei den Säuregruppen angegebenen Bezeichnungen C2-C12 repräsentieren die jeweilige Anzahl der C-Atome der Fettsäurekomponente der eingesetzten Nitrophenylester. n.n., nicht nachweisbar.

Zur Bestimmung der Aktivität verschiedener Enzympräparationen wurden routinemäßig Testansätze, wie oben beschrieben, durchgeführt, wobei einheitlich o-Nitrophenylbutyrat als Substrat eingesetzt wurde.

5 Beispiel 8

Hydrolyse von Triglyceriden mit Esterase EP10 Präparationen

Die Fähigkeit von Esterase EP10 Präparationen zur Hydrolyse von Triglyceriden mit verschiedenen
 10 langen Fettsäureketten wird mittels eines Agardiffusionstests festgestellt. Dazu wird LB-Agarmedium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar) mit 3 g/l des zu untersuchende Triglycerids versetzt. Nach dem Autoklavieren (20 min, 121°C) wird das Medium auf ca. 60°C abgekühlt, mit 100 mg/l Ampicillin-Na Salz und 25 mg/l Chloramphenicol versetzt und anschließend für 30 s mit dem Ultra Turrax T25 bei 24.000 Upm homogenisiert. Anschließend wird das Medium in sterile Petrischalen ausgegossen (je 25 ml).
 15 Aus den so hergestellten, aufgrund der fein emulgierten Triglyceride trüben Agarplatten, werden nun mit einer sterilen Pasteurpipette feine zylinderförmige Stücke ausgestochen. In die entstehenden Löcher können nunmehr bis zu 20 Mikroliter Enzympräparat eingefüllt werden. Neben Enzympräparationen von Esterase EP10 (Herstellung siehe Beispiel 6), werden zum Vergleich auch Esterase aus Rattenleber (Fa. Sigma) und Lipase aus *Candida cylindracea* (Typ VII Fa. Sigma) aufgetragen. Von diesen Enzymen wird
 20 standardmäßig je 1 Unit (für die Esterasen bezogen auf o-Nitrophenylbutyrat) aufgetragen und die Platten bei 37°C bis zum Sichtbarwerden von Aufklarungszonen um die Auftragestellen (üblicherweise für 3 bis 8 Tage) inkubiert. Aus der Größe der Aufklarungshöfe und aus der Intensität der Aufklarung kann halbquantitativ auf die Aktivität der Esterasepräparationen bzw. der Vergleichsenzyme geschlossen werden. In Tabelle 5 sind die entsprechenden Daten für die Hydrolyse von Triglyceriden mit Fettsäuren einer Kettenlänge von
 25 4 bis 10 C-Atomen zusammengestellt. Daraus kann ersehen werden, daß die Esterase EP10 im Vergleich zur Rattenleber-Esterase bessere Aktivitäten zeigt.

Tabelle 5

Hydrolyse von Triglyceriden, deren Fettsäurekomponenten verschiedene Kettenlängen (C2-C12) aufweisen, mit Esterase EP10, Rattenleber-Esterase und Lipase (aus <i>Candida cylindracea</i>).					
Enzym	C2	C6	C8	C10	C12
30 Lipase (<i>C. cylindracea</i>)	++++	++++	+++	+++	+++
35 Rattenleber-Esterase	++++	++	+	-	-
Esterase EP10	++++	++++	+++	+	-

40

Beispiel 9

cis-4-Cyclohexen-1,2-dimethanoldiacetat wird in 0.1 molarem Natriumdihydrogenphosphatpuffer vom
 pH-Wert 7.5 suspendiert (15 ml pro Millimol Substrat) und nach Zugabe einer Esterase EP10 Präparation
 45 (1000 Units pro Millimol Substrat) mechanisch geschüttelt und der Umsatz chromatographisch verfolgt. Nach acht Stunden Reaktionszeit ist hauptsächlich Monoacetat gebildet worden.

Beispiel 10

50 In gleicher Weise wie bei Beispiel 9 wird 1-Octylpropinylacetat mit einer Esterase EP10 Präparation umgesetzt. Nach 12 Stunden Reaktionszeit ist 50% Undec-1-in-3-ol gebildet worden.

Beispiel 11

55 In gleicher Weise wie bei Beispiel 9 wird racemisches (Z)-1-Ethynyl-2-methyl-2-pentenylacetat mit einer Esterase EP10 Präparation umgesetzt. Nach 5 Stunden Reaktion ist 50% (Z)-4-Methylhept-1-in-4-en-3-ol mit einem Enantiomerenüberschuß von 84% gebildet worden. Der Enantiomerenüberschuß des nicht hydrolysierten Esters beträgt 86%.

Beispiel 12

5 Undec-1-in-3-ol wird in Vinylacetat gelöst (10 ml pro Millimol Substrat) und nach Zugabe einer lyophilisierten Esterase EP10 Präparation (10000 Units pro Millimol Substrat) mechanisch geschüttelt und der Umsatz chromatographisch verfolgt. Die Bildung von 1-Octylpropinylacetat erfolgt in den ersten Stunden rasch, später langsam. Nach 60 Stunden Schütteln ist das ganze Ausgangsmaterial umgesetzt. Aus dem Ergebnis kann gefolgert werden, daß die Esterase EP10 Präparation einen leistungsfähigen Katalysator für die Umesterung zwischen Undec-1-in-3-ol und Vinylacetat darstellt.

10 Beispiel 13

In gleicher Weise wie bei Beispiel 12 wird racemisches (Z)-4-Methylhept-1-in-4-en-3-ol mit Vinylacetat und einer lyophilisierten Esterase EP10 Präparation umgesetzt. Nach 60 Stunden ist etwa 50% (Z)-1-Ethynyl-2-methyl-2-pentenylacetat gebildet worden, was auf eine Enantioselektion aus der Racemform
15 hinweist.

Beispiel 14

In gleicher Weise wie bei Beispiel 12 wird 2-Octanol mit Vinylacetat und einer lyophilisierten Esterase EP10 Präparation umgesetzt. Nach 60 Stunden ist etwa 50% 1-Methyl-heptylacetat gebildet worden, was auf eine Enantioselektion aus der Racemform hinweist.
20

Beispiel 15

25 In gleicher Weise wie bei Beispiel 12 wird endo-Bicyclo[2.2.1] hept-5-en-2-ol mit Vinylacetat und einer lyophilisierten Esterase EP10 Präparation umgesetzt. Die Bildung von endo-Bicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-ylacetat erfolgt in den ersten Stunden rasch, später langsam. Nach 60 Stunden Schütteln ist das ganze Ausgangsmaterial umgesetzt. Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, daß die Esterase EP10 Präparation einen leistungsfähigen Katalysator für die Umesterung zwischen endo-Bicyclo- [2.2.1]hept-5-en-2-ol mit
30 Vinylacetat darstellt.

Beispiel 16

In gleicher Weise wie bei Beispiel 9 wird racemisches endo-Bicyclo[2.2.1] hept-5-en-2-ylacetat mit einer
35 Esterase EP10 Präparation umgesetzt. Nach 18 Stunden ist 60% Umsatz festzustellen. der Enantiomerenüberschuß des nicht hydrolysierten Esters beträgt 15%.

Beispiel 17

40 In gleicher Weise wie bei Beispiel 16 wird racemisches endo-Bicyclo[2.2.1] hept-5-en-2-ylbutyrat eingesetzt. Es wird ein analoges Ergebnis wie bei Beispiel 16 erhalten.

Beispiel 18

45 In gleicher Weise wie bei Beispiel 16 wird racemisches endo-Bicyclo[2.2.1] hept-5-en-2-yl octanoat eingesetzt. Es wird ein analoges Ergebnis wie bei Beispiel 16 erhalten.

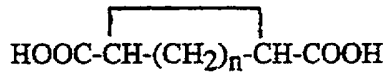
Patentansprüche

- 50 1. Protein, **dadurch gekennzeichnet**, daß es esterolytische Eigenschaften besitzt und die in Figur 5 gezeigte Aminosäuresequenz aufweist.
2. Protein nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es auf einem ca. 1,8 kb großen SacI-Sau3AI DNA-Fragment aus *Pseudomonas marginata* ATCC 10248, dessen Nukleotidsequenz in Figur 5
55 gezeigt ist, kodiert ist.
3. Protein, **dadurch gekennzeichnet**, daß von einem Protein nach einem der Ansprüche 1 und 2 die potentielle N-terminale Signalsequenz entsprechend Figur 6 abgespalten ist.

4. Protein, **dadurch gekennzeichnet**, daß der N-Terminus von einem Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 entsprechend den natürlich vorkommenden Mechanismen, vorzugsweise durch Abspaltung einer oder mehrerer Aminosäuren, modifiziert wurde.
5. Protein, **dadurch gekennzeichnet**, daß es Esterasefunktion aufweist und eine Teilsequenz von einem Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält.
6. DNA Molekül, das für ein Protein mit Esteraseaktivität kodiert und die in Figur 5 gezeigte Nukleotidsequenz aufweist.
7. DNA Molekül nach Anspruch 6, das für ein Protein mit Esteraseaktivität nach den Ansprüchen 1 bis 5 kodiert und eine Teilsequenz der in Figur 5 gezeigten Nukleotidsequenz aufweist.
8. In *Escherichia coli* kloniertes und exprimiertes DNA Molekül nach den Ansprüchen 6 und 7.
9. Durch gentechnische Methoden hergestellter Mikroorganismenstamm, der ein DNA Molekül nach einem der Ansprüche 6 bis 8, welches für ein Protein mit Esteraseaktivität nach einem der Ansprüche 1 bis 5 kodiert, enthält.
10. Durch gentechnische Methoden hergestellter Mikroorganismenstamm nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß der zur Herstellung verwendete Ausgangsstamm den Bakterien zuzuordnen ist.
11. Durch gentechnische Methoden hergestellter Mikroorganismenstamm nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zur Herstellung verwendete rekombinante DNA das Plasmid pGSP10HE ist.
12. Durch gentechnische Methoden hergestellter Mikroorganismenstamm nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß er unter Verwendung von *Escherichia coli* HB101 und dem Plasmid pGSP10HE hergestellt wurde.
13. Verfahren zur Herstellung einer Proteinpräparation, die ein Protein mit esterolytischer-Aktivität nach einem der Ansprüche 1 bis 5 enthält, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein nach einem der Ansprüche 9 bis 12 durch gentechnische Methoden hergestellter Mikroorganismenstamm gezüchtet und dabei das Protein mit esterolytischer Aktivität gebildet wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Herstellung der Stamm *Escherichia coli* HB101, der das Plasmid pGSP10HE trägt, verwendet wird.
15. Enzympräparation mit esterolytischer Aktivität, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie ein Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 5 enthält und entweder die gesamte oder einen Teil einer Mikroorganismenkultur, die mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 13 und 14 erhalten wird, darstellt.
16. Enzympräparation mit esterolytischer Aktivität nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie aus den aus der Kultur abgetrennten Mikroorganismenzellen in feuchter oder getrockneter Form besteht.
17. Enzympräparation mit esterolytischer Aktivität nach den Ansprüchen 15 oder 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie aus dem feuchten oder trockenen Zellhomogenat der aus der Kultur abgetrennten und aufgeschlossenen Mikroorganismenzellen besteht.
18. Enzympräparation mit esterolytischer Aktivität nach den Ansprüchen 15 oder 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie aus dem Kulturüberstand oder einem Konzentrat oder einem Präzipitat davon oder einem durch Trocknung des Kulturüberstands gewonnenen Präparat besteht.
19. Enzympräparation mit esterolytischer Aktivität nach den Ansprüchen 15 oder 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie aus einem Konzentrat oder einem Präzipitat der Mikroorganismenkultur oder aus einem durch Trocknung der Kultur gewonnenen Präparat besteht.

20. Enzympräparation mit esterolytischer Aktivität, **dadurch gekennzeichnet**, daß ausgehend von einer Enzympräparation nach einem der Ansprüche 15 bis 19 eine Anreicherung an Esterase durchgeführt wurde.
- 5 21. Enzympräparation mit esterolytischer Aktivität nach den Ansprüchen 15 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Anteil an Esterase-aktivem Protein zwischen 0,1 % und 99,9% des Gesamtproteins beträgt.
- 10 22. Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureesterverbindungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Protein mit esterolytischer Aktivität nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Katalysator eingesetzt wird.
- 15 23. Verfahren nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Protein mit esterolytischer Aktivität nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Katalysator zur enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäure-Glycerinestern, vorzugsweise mit Kettenlängen der Säurekomponenten von 4 bis 10 C-Atomen, eingesetzt wird
- 20 24. Verfahren nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Protein mit esterolytischer Aktivität nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Katalysator zur enzymatischen Hydrolyse von Nitrophenyl-Carbonsäureestern, vorzugsweise mit Kettenlängen der Säurekomponenten von 2 bis 10 C-Atomen, eingesetzt wird.
- 25 25. Verfahren nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Protein mit esterolytischer Aktivität nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Katalysator zur enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern sekundärer Alkohole eingesetzt wird.
- 30 26. Verfahren nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich um Ester von Alkoholen der allgemeinen Formel $R^1\text{-CHOH-R}^2$ mit Carbonsäuren mit ein bis zehn Kohlenstoffatomen handelt, die in racemischer Form vorliegen, wobei eines der Enantiomeren bevorzugt hydrolysiert werden kann und wobei R^1 von R^2 verschieden ist und beide für einen unverzweigten oder verzweigten Alkylrest mit ein bis zehn Kohlenstoffatomen stehen, wobei diese Reste auch Doppel- oder Dreifachbindungen als Strukturelemente aufweisen können und wobei als Substituenten für R^1 und R^2 ein oder mehrere Halogenatome, wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod, oder Hydroxygruppen, die mit Aldehyden oder Ketonen bis maximal sechs Kohlenstoffatomen acetalisiert sein können, Alkoxygruppen mit ein bis vier Kohlenstoffatomen, Benzyloxygruppen, Amino- oder N-Acylaminogruppen mit zwei bis sieben Kohlenstoffatomen und ein Phenylring oder Naphthylring, der als Substituenten ein oder mehrere Hydroxygruppen oder Halogenatome wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod, Alkoxygruppen mit ein bis vier Kohlenstoffatomen, Benzyloxygruppen oder N-Acylaminogruppen mit zwei bis sieben Kohlenstoffatomen tragen kann, vorkommen können.
- 40 27. Verfahren nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich um Ester von Carbonsäuren mit ein bis zehn Kohlenstoffatomen mit bicyclischen Alkoholen mit Bicyclo[2.1.1]hexan-, Bicyclo[2.2.1]heptan- und Bicyclo[2.2.2]- oder [3.2.1]octanstruktur handelt, die eine Doppelbindung tragen können und als weitere Substituenten Halogenatome wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod, ein oder mehrere Hydroxygruppen, die mit Aldehyden oder Ketonen bis maximal sechs Kohlenstoffatomen acetalisiert sein können, Alkoxygruppen mit ein bis vier Kohlenstoffatomen, Benzyloxygruppen, Amino- oder N-Acylaminogruppen mit zwei bis sieben Kohlenstoffatomen und einen Phenylring oder Naphthylring tragen können, der als Substituenten ein oder mehrere Hydroxygruppen oder Halogenatome wie Fluor, Chlor, Brom oder Jod trägt, oder daß als weitere Substituenten Alkoxygruppen mit ein bis vier Kohlenstoffatomen, Benzyloxygruppen oder N-Acylaminogruppen mit zwei bis sieben Kohlenstoffatomen vorgesehen sind, wobei eines der enantiomeren Produkte bevorzugt gebildet werden kann.
- 50 28. Verfahren nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich um Ester von Carbonsäuren mit ein bis zehn Kohlenstoffatomen der allgemeinen Formel

55



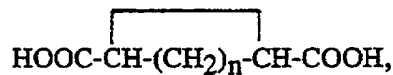
5

mit cis-Cycloalkandimethanolen handelt, wobei n für eine Zahl von eins bis sechs steht, die gegebenenfalls eine Doppelbindung enthalten und als weitere Substituenten ein oder mehrere Hydroxylgruppen tragen, die mit Alkoholen mit ein bis sieben Kohlenstoffatomen verethert sein können sowie auch als Acetale mit Aldehyden bzw. Ketonen mit maximal insgesamt sechs Kohlenstoffatomen vorliegen können, wobei, sofern die enzymatische Hydrolyse der Überführung einer meso-Form in eine chirale Verbindung entspricht, eines der enantiomeren Produkte bevorzugt gebildet werden kann.

10

29. Verfahren nach Anspruch 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Ester von Carbonsäuren der allgemeinen Formel

15



20

wobei n für eine Zahl von eins bis sechs steht, mit Alkoholen mit maximal acht Kohlenstoffatomen, wobei der Ring gegebenenfalls eine Doppelbindung enthalten und als weitere Substituenten ein oder mehrere Hydroxylgruppen auftreten können, die mit Alkoholen mit ein bis sieben Kohlenstoffatomen verethert sein können sowie auch als Acetale mit Aldehyden bzw. Ketonen mit maximal insgesamt sechs Kohlenstoffatomen vorliegen können, enzymatisch hydrolysiert wird, wobei, sofern die enzymatische Hydrolyse der Überführung einer meso-Form in eine chirale Verbindung entspricht, eines der enantiomeren Produkte bevorzugt gebildet werden kann.

25

30. Verfahren zur Umsetzung von Alkoholen mit Estern, wobei die Säuregruppe des Esters auf den Alkohol übertragen wird (Umesterung), **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Protein mit esterolytischer Aktivität nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Katalysator eingesetzt wird.

30

31. Verfahren nach Anspruch 30, **dadurch gekennzeichnet**, daß einer der vorstehend in den Ansprüchen 26 bis 29 genannten Alkohole in einem Enolester wie Vinylacetat oder Isopropenylacetat als Lösungsmittel umgesetzt wird, wobei gegebenenfalls unter Enantioselektion der Alkohol in den entsprechenden Ester wie Essigsäureester übergeführt wird.

35

32. Verwendung eines Proteins mit esterolytischer Aktivität nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Katalysator zur enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern.

40

33. Verwendung eines Proteins mit esterolytischer Aktivität nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Katalysator zur enzymatischen Hydrolyse eines der vorstehend in den Ansprüchen 23 bis 29 genannten Carbonsäureester.

45

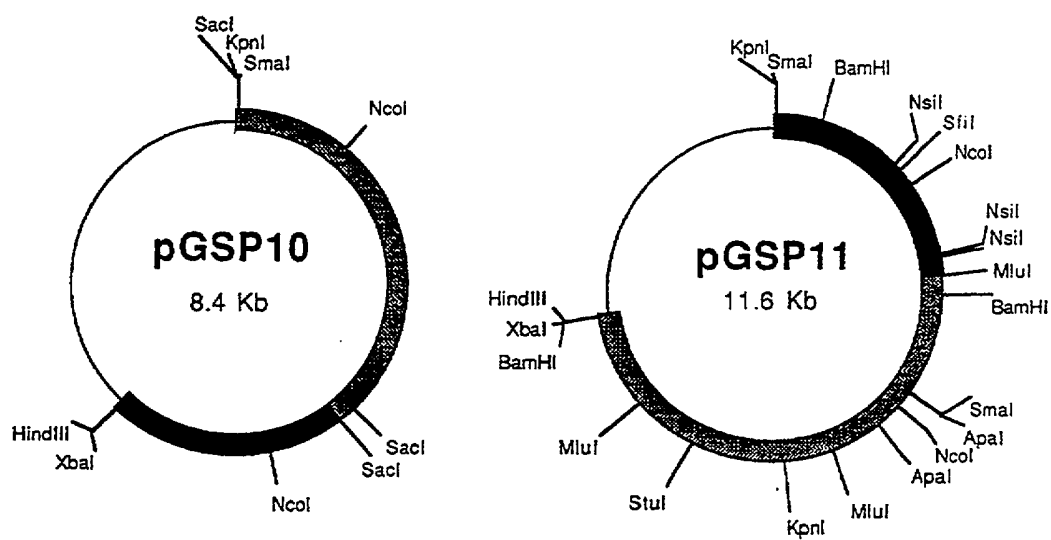
34. Verwendung eines Proteins mit esterolytischer Aktivität nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Katalysator zur Umsetzung von Alkoholen mit Estern (Umesterung).

50

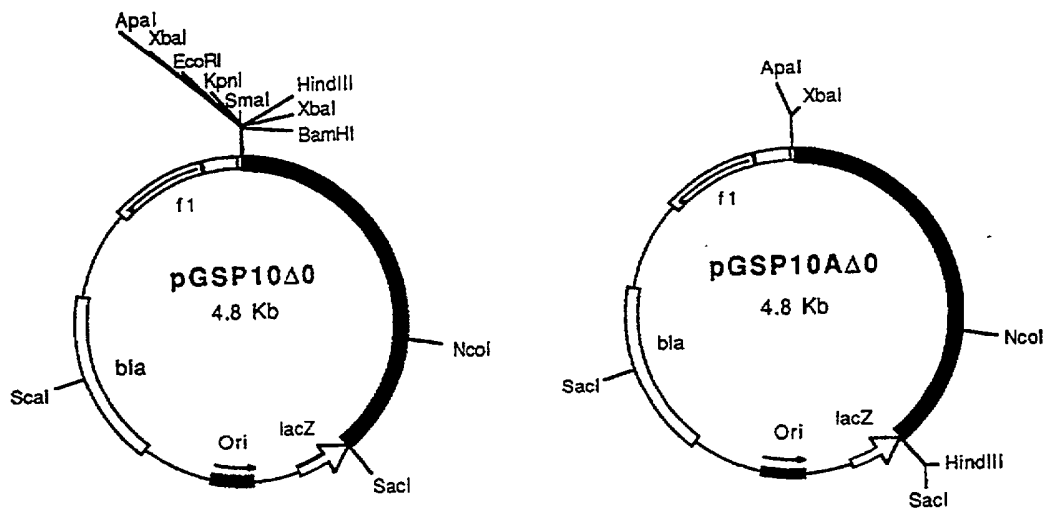
35. Verwendung eines Proteins mit esterolytischer Aktivität nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als Katalysator zur Umsetzung von Alkoholen mit Estern (Umesterung), mit der Maßgabe, daß einer der vorstehend in den Ansprüchen 26 bis 29 genannten Alkohole in einem Enolester wie Vinylacetat oder Isopropenylacetat als Lösungsmittel umgesetzt wird, wobei gegebenenfalls unter Enantioselektion der Alkohol in den entsprechenden Ester wie Essigsäureester übergeführt wird.

55

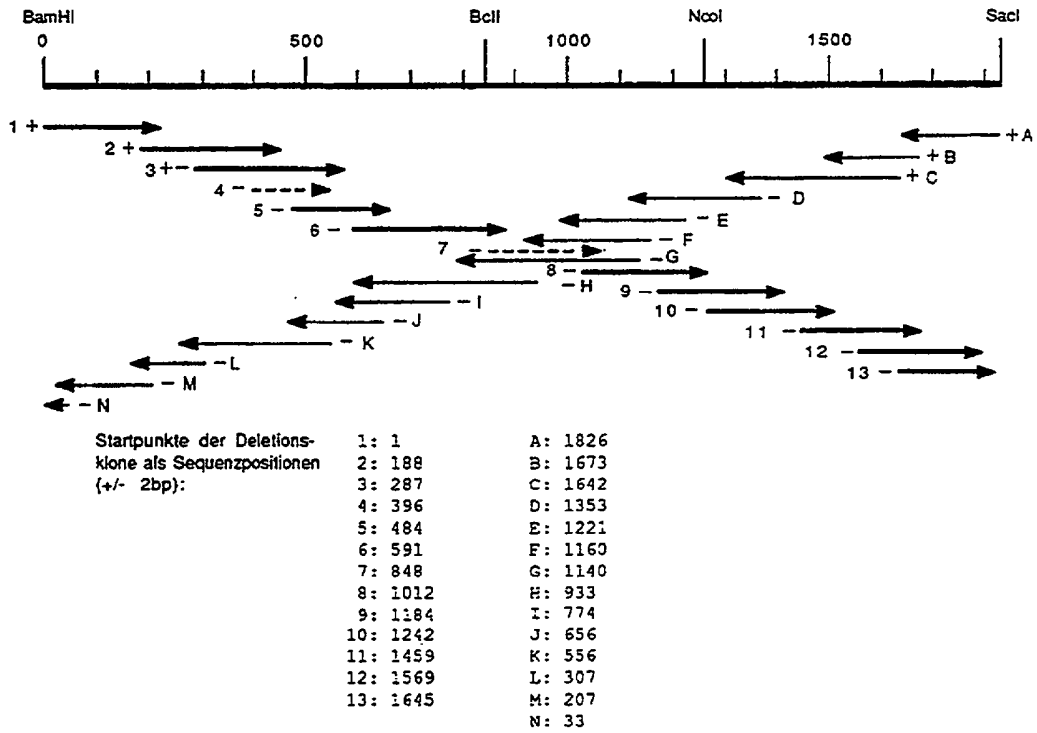
Hiezu 7 Blatt Zeichnungen



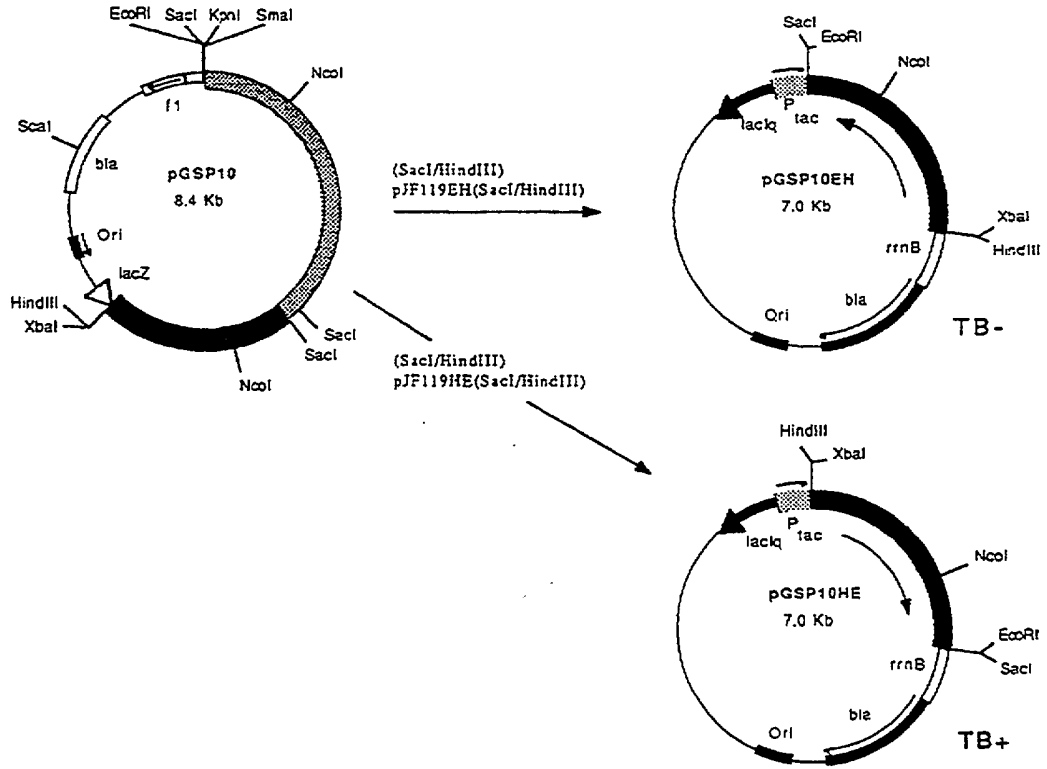
Figur 1



Figur 2



Figur 3



Figur 4

GGATCCGCGC GATCCGCCCG CCTACGGCAT CGTCGAGCCG CTGAATTCGA ACAACCCGCT GGTCCGCGACC
100
TTCCACGAAT GCGGCTCGAT GCGGGCCGAC GCGATCCGCG TCGACGGCCC GCGCAACAAG TGCGCGCGCA
200
TTTTCCGGCC GCCCGAGTGG GCGAGCGCTT ATCATGCGCA GGTTACCGGC ACGTTGCGAC CCGCGACGGC
CGCGGCCCGA AGGGGGCCCG ACGACATGGG GCGACCTGCC GCCGTGCCGC CGGACATCGG GCACCACGGG
300 S/D Met Lys Pro Asn His
TCCGACGACG CATAAACAAA CTGGCCATAT CTACGAGGAG ATGCATGC ATG AAG CCG AAC CAC
Thr Ala Thr Pro Arg Leu Pro Ser Arg Leu Lys Arg Ser Ala Gln Leu Ala
ACC GCC ACG CCC CGC CTG CCG AGC CGC CTG AAG CGC AGC GCG CAG CTC GCG
400
Ile Ala Ser Ala Ala Phe Ala Leu Leu Ala Ala Cys Gly Gly Gly Asp Asp
ATC GCG AGC GCG GCG TTC GCG CTG CTC GCC GCC TGC GGC GGC GGT GAC GAC
Asn Ala Ala Pro Ala Ala Pro Pro Ala Gly Val Gln Lys Gln Ile Val Ser
AAC GCC GCG CCC GCC GCC CCG CCG GCC GGC GTG CAG AAG CAG ATC GTC TCG
Phe Gly Asp Ser Leu Ser Asp Ala Gly Thr Tyr Ser Pro Gln Ile Leu Leu
TTC GGC GAC AGC CTG TCC GAC GCT GGC ACC TAT TCG CCG CAG ATC CTG CTC
500
Gly Phe Gly Gly Gly Arg Phe Thr Thr Asn Pro Gly Glu Val Trp Thr Gln
GGC TTC GGC GGC GGC CGC TTC ACC ACC AAT CCG GGC GAG GTC TGG ACC CAG
600
Lys Val Ala Glu Tyr Phe Gly Asp Thr Leu Lys Pro Ala Tyr Glu Gly Gly
AAG GTG GCC GAA TAC TTC GGC GAC ACG CTC AAG CCC GCC TAC GAA GGC GGC
700
Phe Gly Val Pro Leu Gln Ala Thr Gly Gly Leu Gly Tyr Ala Gln Gly Gly
TTC GGG GTC CCG CTG CAG GCC ACC GGC GGC CTG GGC TAC GCC CAG GGC GGC
Ser Arg Val Thr Leu Gln Pro Gly Leu Gly His Ala Asp Ala Ser Val Pro
TCG CGC GTG ACG CTG CAG CCG GGC CTC GGC CAC GCC GAC GCC TCG GTG CCG
800
Asn Ala Asp Phe Ala Gln Ala Thr Thr Thr Pro Ile Ala Thr Gln Val Gln
AAC GCC GAC TTC GCC CAG GCC ACC ACC ACG CCG ATC GCC ACC CAG GTG CAG
Gln Tyr Leu Gln Ala His Gly Ser Phe Asn Ala Asn Gln Ile Val Leu Ile
CAG TAC CTG CAG GCG CAC GGC AGC TTC AAC GCC AAC CAG ATC GTG CTG ATC
900
Asn Gly Gly Ala Asn Asp Ile Leu Phe Gln Ala Gln Val Ala Ala Ala Ala
AAC GGC GGC GCC AAC GAC ATC CTG TTC CAG GCG CAA GTC GCG GCC GCG GCC

Figur 5

Gly Asn Thr Pro Ala Ala Gln Val Ala Ala Ala Gln Ala Val Gly Leu Ala
GGC AAT ACC CCG GCC GCC CAA GTC GCG GCC GCG CAG GCG GTC GGC CTG GCG
1000
Ala Gln Gln Phe Gly Gln Ile Ile Ala Gln Ile Ala Asn Ala Gly Ala Ser
GCC CAG CAG TTC GGC CAG ATC ATC GCG CAG ATC GCC AAC GCC GGC GCC AGC
His Val Phe Val Ala Asn Met Pro Asp Ile Gly Thr Thr Pro Leu Ala Val
CAC GTG TTC GTC GCC AAC ATG CCC GAC ATC GGC ACC ACG CCG CTG GCG GTG
1100
Ala Gly Gly Ala Ala Thr Gln Ala Ala Leu Thr Gln Leu Ser Gly Leu Phe
GCC GGC GGC GCC GCC ACC CAG GCC GCG CTG ACC CAG CTC TCG GGC CTG TTC
Asn Gln Thr Leu Asn Ala Thr Leu Ala Ala Leu Gln Val Asp Thr Ser Lys
AAC CAG ACG CTG AAC GCC ACG CTC GCC GCG CTG CAG GTC GAC ACC AGC AAG
1200
Val Lys Val Met Asp Val Tyr Thr Trp Gln Asp Gly Ile Gly Ala Asn Phe
GTC AAG GTG ATG GAC GTG TAC ACC TGG CAG GAC GGC ATC GGC GCG AAC TTC
Gln Ala Asn Gly Phe Thr Val Gly Asn Thr Gly Thr Ala Cys Asn Leu Thr
CAG GCC AAC GGC TTC ACG GTC GGC AAT ACC GGC ACG GCC TGC AAC CTG ACC
1300
Ala Met Ala Ala Ala Ala Ala Lys Ala Gly Val Ala Asn Pro Ser Gly Phe
GCC ATG GCG GCG GCC GCC GCG AAG GCC GGG GTG GCC AAT CCG AGC GGC TTC
Ala Ser Ser Leu Phe Cys Ser Pro Gln Thr Tyr Thr Val Ala Asn Ala Asp
GCC TCC TCG CTG TTC TGC TCG CCG CAG ACC TAC ACG GTG GCC AAC GCC GAC
1400
Gln Thr Tyr Met Phe Ala Asp Thr Val His Pro Thr Thr Arg Leu His Ala
CAG ACC TAC ATG TTC GCC GAC ACG GTG CAC CCG ACC ACG CGC CTG CAT GCG
Leu Val Ala Gln Phe Val Glu Gln Gln Ile Ala Ala Ala Gly Val Thr Lys
CTG GTC GCG CAG TTC GTC GAG CAG CAG ATC GCG GCG GCC GGC GTC ACC AAG
*** 1500
TAA GGCCCGCCCA CCCC GGCCGG CCGCTCGATG CATTGGGGCG GTCCGGCAGC GGAAAAAGAA
CGCCCGGCGC GCGACGCGCC GGGGTTTTT CCTTGATGCG CCGGAATCAG GCCGCGGCC GCGGAAGCG
1600
ATCCAGGTTT TCGCGCAGCC AATCCGTGAG CGAACGCGGC GGACGTCCCG TCAATTCCTC CACCGTGCGC
1700
GTGGTCTCGC CGATGCCCGA GCGCGCATC AGCCGGTCTGA GCCCGACCAG CAGGTCCGCG ACGAAGGGCG
1800
GCAGGCCGCC GGCCAGCAGC AGCCGCTGCT GTCGGCCAG CGAGCGCTGC GCATAGGCGA CCGGGCGATC
1826
GAGCAGGCCG GAGAGCTC

Fortsetzung von Figur 5

