

(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
7. Mai 2009 (07.05.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/056343 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/009223

(22) Internationales Anmeldedatum:
31. Oktober 2008 (31.10.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2007 052 344.2
2. November 2007 (02.11.2007) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **GENEART AG** [DE/DE]; Josef-Engert-Strasse 11,
93053 Regensburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **LISS, Michael**
[DE/DE]; Wöhrdstr. 14, 93059 Regensburg (DE).
DERER, Jutta [DE/DE]; Drei-Mohren-Str. 15, 93047
Regensburg (DE).

(74) Anwälte: **WEICKMANN & WEICKMANN** usw.; Post-
fach 860 820, 81635 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Veröffentlicht:

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

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING FRAMESHIFT MUTATIONS IN CODING NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR FESTSTELLUNG VON FRAMESHIFT-MUTATIONEN IN KODIERENDEN NUKLE-
INSÄUREN

(57) Abstract: The invention relates to a method for determining frameshift mutations in coding nucleic acid sequences.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Frameshift-Mutationen in kodie-
renden Nukleinsäuresequenzen.



WO 2009/056343 A1

VERFAHREN ZUR FESTSTELLUNG VON FRAMESHIFT-MUTATIONEN IN KODIERENDEN NUKLEINSÄUREN

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Frameshift-Mutationen in kodierenden Nukleinsäuresequenzen.

10

Genetische Information ist in kodierenden Nukleinsäuren in Form von Basentriplets oder Kodons organisiert. Bei der Gensynthese treten jedoch häufig Fehler in Form unterschiedlicher Arten von Mutationen auf. Bei den Mutationen handelt es sich großteils um Einzelbasendeletionen und Insertionen (ca. 90 %). Im Gegensatz zu den meisten Substitutionen führen nahezu alle Insertionen und Deletionen zu so genannten Frameshifts. Geht eine Base eines Gens im Rahmen einer Mutation verloren (Deletion) oder wird eine Base hinzugefügt (Insertion), so verändert sich das Leseraster der nachfolgenden Basentriplets. Eine Frameshift-Mutation hat biologisch wesentlich größere Auswirkungen als eine Substitution. Ab der Insertion/Deletion werden andere Aminosäuren kodiert und es kommt meist zu einem Abbruch der Translation durch out-of-frame Stoppkodons.

15

20

25

30

Mit zunehmender Länge eines synthetisierten Gens steigt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Mutation stark an. Der Großteil der ungewollten Mutationen kommt durch das Fehlen oder die Insertion von Einzelbasen in Oligonukleotiden zustande. Die Wahrscheinlichkeit einer Substitution einer Base liegt bei der Synthese von Genen oder Genbibliotheken bei etwa 0,1-0,2 ‰ pro Position, die Wahrscheinlichkeit für eine Insertion/Deletion liegt bei 1,0-1,5 ‰ pro Position. Beispielsweise beobachteten Kong et al., Nucleic Acids Res. (2007), 35:e61 bei der Chip-basierten Gensynthese eine Deletionsrate von 1,48 ‰ pro Position und eine Substitutionsrate von 0,3 ‰ pro Position. Etwa die Hälfte der Substitutionen kommt wiederum durch PCR-Fehler zustande.

- 2 -

Die bei Insertionen und Deletionen auftretende Verschiebung des Leserasters kann genutzt werden, um über einen Reportervektor solche Nukleinsäure-Fragmente zu selektieren, deren Leseraster intakt ist. So offenbart die europäische Patentanmeldung EP 0 872 560 ein Verfahren zur Bestimmung von Frameshift-Mutationen, bei dem mittels homologer Rekombination ein Konstrukt erzeugt wird, das einen Promotor, ein zu untersuchendes Gen und im gleichen Leseraster mit dem zu untersuchenden Gen ein Reportergen enthält. Bei der Expression des Leserasters wird ein Fusionsprotein erhalten, welches die Reportergerfunktion beinhaltet. Dieses kann über phänotypische Eigenschaften nachgewiesen werden.

Problematisch ist allerdings, dass das zu untersuchende Gen für die in EP 0 872 560 beschriebene Vorgehensweise keine internen Stoppkodons innerhalb des offenen Leserasters (ORF) aufweisen darf. Dies ist jedoch bei vielen synthetisierten Genen der Fall.

Angesichts der obigen Problematik war die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Bestimmung von Frameshift-Mutationen bereitzustellen, das für beliebige codierende Nukleinsäuren und insbesondere auch für Nukleinsäuren, welche interne Stoppkodons umfassen, geeignet ist.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung von Frameshift-Mutationen in kodierenden Zielnukleinsäuren, welche die Schritte umfasst:

- (i) Bereitstellen einer Wirtszelle, umfassend eine doppelsträngige Nukleinsäure, welche eine kodierende Zielnukleinsäure und eine dazu komplementäre, kodierende Gegenstrangnukleinsäure umfasst, worin die Gegenstrangnukleinsäure in operativer Verknüpfung mit einem Reportergen in 3' Position vorliegt;
- (ii) Bewirken der Expression der Gegenstrangnukleinsäure; und
- (iii) Bestimmen, ob in der Wirtszelle eine Expression des Reportergens

erfolgt,
worin die Expression des Reportergens anzeigt, dass die Zielnukleinsäure keine Frameshift-Mutation aufweist.

5 Der Begriff „keine Frameshift-Mutation“ ist erfindungsgemäß so zu verstehen, dass die Zielnukleinsäure entweder überhaupt keine Frameshift-Mutation aufweist oder dass in der Zielnukleinsäure mehrere Mutationen vorliegen, die für sich betrachtet, zu einer Verschiebung des Leserahmens führen würden, die sich aber gegenseitig wieder aufheben. Beispielsweise
10 kann in der Zielnukleinsäure eine Kombination von Insertionen und Deletionen vorliegen, die sich aber gegenseitig wieder aufheben, so dass keine Änderung des Leserasters auftritt und das Reportergen weiter korrekt abgelesen werden kann.

15 Die Erfinder haben herausgefunden, dass für die Bestimmung von Frameshift-Mutationen anstelle der kodierenden Zielnukleinsäure eine dazu komplementäre kodierende Gegenstrangnukleinsäure genutzt werden kann.

Der Begriff „kodierend“ ist in diesem Zusammenhang so zu verstehen, dass
20 die Gegenstrangnukleinsäure so beschaffen ist, dass sie die Expression des 3' verknüpften Reportergens ermöglicht. Die Gegenstrangnukleinsäure muss zu diesem Zweck aber nicht unbedingt durch einen offenen Leserahmen definiert sein.

25 Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird zunächst eine Wirtszelle bereitgestellt, die eine doppelsträngige Nukleinsäure umfasst, welche eine kodierende Zielnukleinsäure und eine dazu komplementäre, kodierende Gegenstrangnukleinsäure enthält. Bei der Zielnukleinsäure handelt es sich vorzugsweise um eine synthetisch erzeugte Sequenz. Die
30 Gegenstrangnukleinsäure ist in der Wirtszelle operativ mit einem Reportergen verknüpft, welches sich stromabwärts in 3'-Position befindet.

Wenn die Gegenstrangnukleinsäure intakt ist, d.h. keine Mutationen wie

- 4 -

insbesondere Insertionen oder Deletionen aufweist, die eine Änderung des Leserasters zur Folge haben, so wird bei der Expression ein Fusionspolypeptid erhalten, das die von der Gegenstrangnukleinsäure kodierte Aminosäuresequenz sowie C-terminal davon die Aminosäuresequenz des von dem Reportergen kodierten Produkts aufweist. Wenn die Gegenstrangnukleinsäure dagegen eine Frameshift-Mutation aufweist, d.h. insbesondere eine Insertion oder Deletion, durch die sich das Leseraster ändert, so führt diese Verschiebung des Leserasters dazu, dass das Reportergen nicht in-frame zu der kodierenden Gegenstrangnukleinsäure liegt. Folglich wird das Reportergen nicht exprimiert. Der Reporter wird also nur dann exprimiert, wenn das Leseraster des Gegenstrangs intakt ist.

Wenn die Gegenstrangnukleinsäure keine Frameshift-Mutationen aufweist, so kann daraus geschlossen werden, dass auch die komplementäre Zielnukleinsäure selbst intakt ist und keine Frameshift-Mutationen aufweist.

Das Verfahren der vorliegenden Erfindung hat den Vorteil, dass selbst bei Vorliegen von internen Stoppkodons in der Zielnukleinsäure eine Bestimmung von Frameshift-Mutationen mittels Verwendung eines Reportergens möglich ist. Interne Stoppkodons der Zielnukleinsäure werden bei der Nutzung des Leserasters im Gegenstrang als Leu bzw. Ser translatiert. Die Nutzung eines Leserasters im Gegenstrang hat weiterhin den Vorteil, dass eine mögliche Toxizität des von der eigentlichen Zielnukleinsäure kodierten Proteins für die Wirtszelle nicht relevant ist, da nur der Gegenstrang translatiert wird.

Für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist eine kodierende Gegenstrangnukleinsäure erforderlich. Ein Leseraster im Gegenstrang kann ggf. durch entsprechende Optimierung der Gegenstrangsequenz erreicht werden. Weiterhin sollte die Gegenstrangnukleinsäure keine internen Stoppkodons enthalten. Die komplementären Kodons zu den drei Stoppkodons sind relativ selten, daher

- 5 -

enthält ein Leseraster im Gegenstrang in der Regel keine Stoppkodons. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Gegenstrangnukleinsäure ggf. so optimiert, dass keine internen Stoppkodons enthalten sind.

5 In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform ist die Gegenstrangnukleinsäure in der Wirtszelle in 3'-Position operativ mit einem Reporter gen verknüpft und in 5'-Position operativ mit einer Expressionskontrollsequenz verknüpft.

10 Eine Expressionskontrollsequenz ist erfindungsgemäß eine Nukleinsäuresequenz, welche die Transkription und Translation kontrolliert und reguliert. Die Expressionskontrollsequenz kann in der Wirtszelle konstitutiv oder regulierbar aktiv sein. Die Formulierung „operativ verknüpft“
15 schließt ein geeignetes Startsignal (z.B. ATG oder AUG) vor der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und die Beibehaltung des korrekten Leserasters ein, sodass die Expression der Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle der Expressionskontrollsequenz und die Erzeugung des von der Nukleinsäuresequenz kodierten Produktes ermöglicht wird. Wenn eine Nukleinsäure kein geeignetes Startsignal enthält, so kann ein solches
20 Startsignal vor der Nukleinsäure eingefügt werden.

Die Bereitstellung einer Wirtszelle in Schritt (i) des erfindungsgemäßen Verfahrens beinhaltet in einer Ausführungsform das Einbringen eines Expressionsvektors in eine Wirtszelle, wobei der Expressionsvektor die
25 doppelsträngige Nukleinsäure umfasst, welche eine kodierende Zielnukleinsäure und eine dazu komplementäre kodierende Gegenstrangnukleinsäure umfasst.

Expressionsvektoren sind dem Fachmann auf dem Gebiet der
30 Molekularbiologie bekannt und beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbour, Laboratory Press, beschrieben. Als Expressionsvektor kann beispielsweise ein Plasmid oder ein viraler Vektor verwendet werden.

Die Gegenstrangnukleinsäure kann in dem Expressionsvektor in einer Ausführungsform in operativer Verknüpfung mit einem Reportergen in 3'-Position vorliegen. Alternativ kann der Expressionsvektor in einer anderen Ausführungsform zusammen mit einem Reportervektor, welcher das Reportergen umfasst, in eine Wirtszelle eingebracht werden. In einer weiteren Ausführungsform kann der Expressionsvektor auch in eine Wirtszelle eingebracht werden, die bereits ein Reportergen enthält.

Vorzugsweise ist die Gegenstrangnukleinsäure in dem Expressionsvektor operativ mit einer Expressionskontrollsequenz in 5'-Position verknüpft. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Gegenstrangnukleinsäure in dem Expressionsvektor in 3'-Position mit einem Reportergen und in 5'-Position mit einer Expressionskontrollsequenz operativ verknüpft.

Ein erfindungsgemäßer Expressionsvektor kann auf beliebige Weise erzeugt werden, beispielsweise durch Kultivierung in Wirtszellen, vorzugsweise in Bakterienzellen wie etwa *E. coli*-Zellen. Zweckmäßigerweise beinhaltet der Expressionsvektor Elemente, die eine Replikation und Selektion in der Wirtszelle ermöglichen. Alternativ kann ein Expressionsvektor auch *in vitro* durch Amplifikation in ausreichender Menge erzeugt werden, beispielsweise durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Ligase-Kettenreaktion (LCR) oder Rolling-Circle-Amplifikation.

Als Wirtszellen können prokaryotische oder eukaryotische Zellen oder Mikroorganismen verwendet werden. Bei den Wirtszellen kann es sich um Wildtyp-Varianten handeln oder es können mutierte oder genetisch manipulierte Wirtszellen verwendet werden.

Als Reportergen kann gemäß der Erfindung ein für ein nachweisbares Genprodukt kodierendes Gen verwendet werden. Beispielsweise kann das Reportergen ein Antibiotika-Resistenzgen, vorzugsweise Kanamycin-

- 7 -

Resistenz umfassen. In einer anderen Ausführungsform kann ein Reporter gen verwendet werden, welches für ein Fluoreszenzprotein wie etwa GFP kodiert. Weiterhin kann ein Reporter gen verwendet werden, das für ein Enzym kodiert, durch das eine colorimetrisch messbare Reaktion katalysiert wird (z.B. β -Galaktosidase). In einer weiteren Ausführungsform kann das Reporter gen für ein Genprodukt kodieren, welches mit einer in der Wirtszelle vorhandenen Nukleinsäuresequenz oder mit einem in der Wirtszelle expremierten Genprodukt wechselwirkt, wodurch es zu einer messbaren Veränderung einer Stoffwechselleistung kommt.

10

Das Einbringen von Expressionsvektor und gegebenenfalls Reporter vektor in die Wirtszelle erfolgt nach im Stand der Technik bekannten Verfahren, beispielsweise durch (Co)Transfektion, (Co)Transformation oder (Co)Infektion von Zellen. Vorzugsweise wird das Verfahren so gewählt, dass die doppelsträngige Nukleinsäure in die Wirtszelle eingebracht wird, sodass in der Wirtszelle die Gegenstrangsequenz operativ mit dem Reporter gen verknüpft ist.

15

Bei eukaryotischen Wirtszellen kann die Transfektion bzw. Cotransfektion beispielsweise durch Calciumphosphat-Copräzipitation, Lipofektion, Elektroporation, Partikelbeschuss, Verwendung von Bakterienproteinen oder durch virale Infektion über Retroviren, Adenoviren etc. erfolgen.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird in Schritt (i) des Verfahrens ein Vektor bereitgestellt, der zusätzlich zu dem operativ mit der Gegenstrangnukleinsäure verknüpften Reporter gen mindestens ein Selektionsmarkergen umfasst. Das mindestens eine Selektionsmarkergen ist ausgewählt aus beliebigen für ein nachweisbares Genprodukt kodierenden Genen, wobei das Genprodukt vorzugsweise von dem Genprodukt des Reporter gens verschieden ist. Beispielsweise kann das Selektionsmarkergen ein Antibiotikaresistenzgen wie etwa β -Lactamase für Ampicillinresistenz umfassen. Alternativ kann als Selektionsmarkergen ein für ein Fluoreszenzprotein wie etwa GFP kodierendes Gen verwendet werden.

25

30

Über das Selektionsmarkergen kann unabhängig von dem Reportergen eine Selektion erfolgen. Beispielsweise kann ein Konstrukt nach erfolgter Selektion auf das erste Reportergen (beispielsweise auf
5 Kanamycinresistenz) über Selektion mittels des weiteren Selektionsmarkergens (z.B. für Ampicillinresistenz) weiter hochamplifiziert werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, Konstrukte die eine Frameshift-Mutation enthalten (z.B. eine absichtliche Frameshift-Mutation) durch Selektion über das zweite Selektionsmarkergen weiter zu
10 amplifizieren.

Schließlich kann das zweite Selektionsmarkergen dazu beitragen, die Existenz des Reportergens im Zusammenhang mit einer stattgefundenen Selektion zu verschleiern, um so das Verfahren vor Nachahmung zu
15 schützen.

Schritt (ii) des erfindungsgemäßen Verfahrens beinhaltet das Bewirken der Expression der Gegenstrangnukleinsäure in der Wirtszelle. Hierzu wird die Wirtszelle unter geeigneten Bedingungen kultiviert, die eine Expression der
20 Gegenstrangnukleinsäure erlauben.

Schritt (iii) beinhaltet die Bestimmung, ob in der Wirtszelle eine Expression des Reportergens erfolgt. Die Bestimmung beruht darauf, dass ein von dem Reportervektor codiertes Genprodukt nachgewiesen wird. Die Bestimmung
25 kann abhängig von dem verwendeten Reportergen grundsätzlich die Bestimmung beliebiger phänotypisch erkennbarer Effekte umfassen, beispielsweise morphologische Veränderungen, Änderungen des Wachstumsverhaltens, etc. Wenn das Reportergen beispielsweise ein Fluoreszenzprotein wie GFP kodiert, so kann das Vorhandensein und/oder
30 die Intensität der Lumineszenz z.B. mittels Fluoreszenzcytometrie oder Imaging-Assays bestimmt werden. Wenn als Reportergen ein Antibiotika-Resistenzgen verwendet wird, so kann die Bestimmung auf Grundlage des Wachstums von Wirtszellen in Gegenwart von Antibiotika erfolgen.

In einer Ausführungsform der Erfindung kann eine Zielnukleinsäure aus zwei, drei oder mehreren Teilfragmenten zusammengesetzt sein. Beispielsweise können bei einem Konstrukt mit 3 kB zunächst drei
5 Teilfragmente aus Oligonukleotiden hergestellt werden und diese Teilfragmente dann z.B. über Fusions-PCR zu einem 3 kB-Fragment fusioniert werden. Ein so fusioniertes Konstrukt aus zwei oder mehreren Teilfragmenten kann dann direkt in einen erfindungsgemäßen Expressionsvektor ligiert werden.

10 Da mit dem erfindungsgemäßen Verfahren Frameshift-Mutationen, aber keine Mutationen unter Erhalt des Leserasters bestimmt werden können, wird bei der Synthese der Zielnukleinsäure durch PCR vorzugsweise der Amplifikationsprimer zu einem möglichst späten Zeitpunkt zugegeben, um
15 die Anzahl der Amplifikationsschritte möglichst klein zu halten. Je höher die Anzahl amplifizierbarer Volllängenmoleküle, desto weniger durch PCR zustandegekommene Mutationen sind im PCR-Produkt enthalten.

Um Substitutionen noch weiter zu verringern, kann beispielsweise Ofloxazin
20 nach der Transformation eingesetzt werden. Ofloxazin ist ein Gyrasehemmer, der die DNA-Replikation hemmt, Wirtszellen wie *E. coli*-Zellen jedoch kurzfristig nicht tötet. Während dieses Zeitraums besteht für eine Wirtszelle die Möglichkeit, Heterodimere über einen internen Reparaturmechanismus zu spalten. Vorzugsweise kann Ofloxazin im
25 Medium nach der Elektroporation oder Hitzeschocktransformation enthalten sein (0,5-1 h bei 37 °C). Im Anschluss werden die Zellen abzentrifugiert, das Medium zusammen mit dem Ofloxazin entfernt und die Zellen werden ausplattiert.

Figuren

Figur 1 zeigt die Plasmidkarte eines erfindungsgemäßen Expressionsvektors. Als Reportergen ist Kanamycinresistenz stromabwärts der Gegenstrangnukleinsäure MCS enthalten.

Figur 2 Ausstrichplatten von Kolonien mit Kanamycin-Selektionsvektoren (pFrame2A3b und pFrameT1) mit unterschiedlichen KpnI/SacI Insertionen. Bei den Insertionen auf Platte A) und B) handelt es sich einerseits um beta-Lactamase inclusive Promotor (A und B, oben), welche in umgekehrter Orientierung zum Kanamycin-Resistenzgen kloniert vorliegt und Amp-Resistenz vermittelt, jedoch keine Kana-Resistenz zulässt, da der Gegenstrang von Promotor+beta-Lactamase keinen offenen Leserahmen beinhaltet, sowie andererseits um eGFP (A und B, unten), welches hier in gleicher Orientierung und in-frame zum Kanamycin-Resistenzgen kloniert vorliegt. Hier ermöglicht der durchgehende Leserahmen des Plusstranges von eGFP die Expression der Kanamycin-Resistenz, während die fehlende Ampicillin-Kassette natürlich kein Wachstum auf Ampicillin zulässt. Diese Daten zeigen, dass eine Selektion auf Sequenzen mit offenem Leserahmen mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens möglich ist.

Demgegenüber sind auf den Platten C) und D) drei Kolonien ausgestrichen, welche im Kanamycin-Selektionsvektor pFrame2A3b drei unterschiedliche Insertionen in negativer Orientierung beinhalten, wobei alle drei einen offenen Leserahmen auch im Minusstrang besitzen. Bei den Insertionen handelt es sich um die Gene für eGFP (735 bp), Influenza-Neuraminidase (1398 bp) und humanes CpG-bindendes Protein MBD4 (1755 bp).

Alle drei Konstrukte sind dazu in der Lage, auf Kanamycin zu wachsen. Es ist jedoch auch deutlich, dass im Einzelfall - hier insbesondere MBD4 (-) und im geringerem Maße auch Neuraminidase(-) und eGFP(-) - das Wachstum bei 30 °C anstelle von 37 °C stabiler ist.

Diese drei Fusionsproteine aus Minusstrang-Translation plus Neomycin-Phosphotransferase sind also dazu in der Lage, die phänotypische & selektierbare Kanamycin-Resistenz zu vermitteln.

5 **Figur 3** zeigt die Sequenzen der drei Insertionen aus Fig. 2 mit annotierter Plus- und Minustranslation.

Figur 4 veranschaulicht einen Vergleich der Selektion codierender Nukleinsäurekonstrukte auf Abwesenheit von Framshiftmutationen mit Hilfe
10 eines klassischen Klonierungsvektors und eines erfindungsgemäßen Klonierungsvektors. Die grauen Balken zeigen das Ergebnis der Selektion unter Verwendung des klassischen Klonierungssektors pCR-Skript, die weißen Balken zeigen das Ergebnis der Selektion unter Verwendung des erfindungsgemäßen Selektionsvektors pFr2b.

15

Beispiel

Selektion auf Abwesenheit von Frameshiftmutationen

20 Ein komplett aus Oligonukleotiden hergestelltes Konstrukt mit einer Länge von 684 bp wurde über die Restriktionsenzyme KpnI/SacI in den herkömmlichen Klonierungssektor pCR-Skript und in den erfindungsgemäßen Selektionsvektor pFr2b kloniert. Die Sequenz des Konstrukts wurde über
25 alternative Codonwahl so konzipiert, dass sie neben dem biologisch relevanten Leserahmen (mit terminalem Stoppkodon) einen zweiten offenen Leserahmen in Gegenrichtung aufweist. Dies hat jedoch kein Einfluss auf das auf dem Sinnstrang kodierte biologisch relevante Protein.

Durch die Ligation des Konstrukts (Insert) in den Vektor pFr2b entsteht ein
30 offener Leserahmen innerhalb des Vektors, der sich zusammensetzt aus Start + reverses Insert + Selektionsgen (Kana). Nur bei intaktem Leserahmen des Inserts kann Kana korrekt translatiert werden und der Zelle/ Kolonie das Wachstum ermöglichen.

Die Ligationen wurden in *E. coli* transformiert und auf Selektionsplatten mit 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Von gewachsenen Einzelkolonien wurde Plasmid-DNA präpariert, sequenziert und nach den folgenden, in Tabelle 1 aufgeführten Kriterien analysiert.

5

Tabelle 1

Konstrukt	0800349	0800349
Vektor	pCR-Script	pFr2b
Orientierung	Reverse	Reverse
Größe	684 bp	684 bp
Peer Gruppe	37	23
Insertionen Gesamt	12	0
Insertionen pro Konstrukt	0.32	0.00
Insertionen pro kb	0.47	0.00
Deletionen Gesamt	20	4
Deletionen pro Konstrukt	0.54	0.17
Deletionen pro kb	0.79	0.25
Konstrukte mit InDel	22	3
Konstrukte mit InDel (%)	59%	13%
Konstrukte mit in-frame InDel	2	3
Konstrukte mit in-frame InDel (%)	5%	13%
Transitionen Gesamt	2	2
Transitionen pro Konstrukt	0.05	0.09
Transitionen pro kb	0.08	0.13
Transversionen Gesamt	1	0
Transversionen pro Konstrukt	0.03	0.00
Transversionen pro kb	0.04	0.00
Konstrukte mit Substitution	3	2
Konstrukte mit Substitution (%)	8%	9%
Konstrukte mit ORF	17	23
Konstrukte mit ORF (%)	46%	100%
Konstrukte ohne InDels	15	20
Konstrukte ohne InDels (%)	41%	87%
Korrekte Konstrukte	15	18
Korrekte Konstrukte (%)	41%	78%

- 13 -

InDels		pCR-Script	pFr2b
Del >3 bp (Größe)		3 (8bp, 591bp, 456bp)	0
	Del 3 bp	0	2
	Del 2 bp	1	1
	Del 1 bp	15	1
	Ins 1 bp	12	0
	Ins 2 bp	0	0
	Ins 3 bp	0	0
	Ins >3 bp	0	0

Die in der vorstehenden Tabelle 1 verwendeten Begriffe und Abkürzungen haben die nachstehenden Bedeutungen:

5	Konstrukt	Bezeichnung des Konstrukts. Das Gen wurde jeweils über KpnI/SacI in die Vektoren kloniert.
	Vektor	pCR-Script : klassischer Klonierungsvektor; pFr2b : erfindungsgemäßer Selektionsvektor für offene Leserahmen
10	Orientierung	Orientierung, in die in den Vektor kloniert wurde. Nur relevant für pFr2b. Hier wurde also so kloniert, dass der <u>reverse</u> Leserahmen des Gens mit der Selektionskassette fusioniert vorliegt.
	Größe	Länge des Gens in bp.
15	Peer Gruppe	Anzahl der sequenzierten Klone.
	Insertionen Gesamt	Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Insertionen.
	Insertionen pro Konstrukt	Berechnete Insertionen pro Konstrukt.
20	Insertionen pro kb	Berechnete Insertionen pro Kilobase.
	Deletionen Gesamt	Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Deletionen.
	Deletionen pro Konstrukt	Berechnete Deletionen pro Konstrukt.
25	Deletionen pro kb	Berechnete Deletionen pro Kilobase.
	Konstrukte mit InDel	Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen

- 14 -

5		Konstrukte mit mindestens einer Insertion oder Deletion. Im Falle von pFr2b ist dies nicht identisch mit der Summe aller Insertionen + Deletionen, da es hier z.B ein Konstrukt mit zwei Deletionen gibt.
10	Konstrukte mit InDel (%)	Prozentualer Anteil an Konstrukten in der Stichprobe mit mindestens einer Insertion oder Deletion. Im Falle von pFr2b werden deutlich weniger Konstrukte mit InDels gefunden (13% gegenüber 59%). Siehe Figur 4.
15	Konstrukte mit in-frame InDel	Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Konstrukte mit mindestens einer Insertion oder Deletion, die jedoch nicht zu einer Unterbrechung des offenen reversen Leserahmens führen. Man beachte, dass im Falle von pFr2b die drei Konstrukte mit einer InDel noch immer einen intakten offenen reversen Leserahmen aufweisen. Dies liegt daran, dass zwei Konstrukte eine Deletion von 3 bp haben, ein Konstrukt eine Deletion von 1 bp und kurz dahinter noch einmal eine Deletion von 2 bp - die Leserahmen werden hier nicht unterbrochen, da die Deletionen durch drei teilbar sind, wie im allgemeinen Teil der Beschreibung erwähnt ist.
20		
25	Konstrukte mit in-frame InDel (%)	Prozentualer Anteil an Konstrukten in der Stichprobe, mit mindestens einer Insertion oder Deletion, die jedoch nicht zu einer Unterbrechung des offenen reversen Leserahmens führen.
30	Transitionen Gesamt	Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Transitionen. (Purin <-> Purin oder Pyrimidin <-> Pyrimidin).
35		Die Tatsache, dass Transitionen häufiger beobachtet werden als Transversionen, deutet

- 15 -

		darauf hin, dass die Substitutionen nicht durch Oligonukleotidfehler eingeführt wurden, sondern durch PCR-Fehler.
	Transitionen pro Konstrukt	Berechnete Transitionen pro Konstrukt.
5	Transitionen pro kb	Berechnete Transitionen pro Kilobase.
	Transversionen Gesamt	Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Transversionen. (Purin <-> Pyrimidin).
	Transversionen pro Konstrukt	Berechnete Transversionen pro Konstrukt.
10	Transversionen pro kb	Berechnete Transversionen pro Kilobase.
	Konstrukte mit Substitution	Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Transitionen + Transversionen (= Substitutionen)
15	Konstrukte mit Substitution (%)	Prozentualer Anteil an Konstrukten in der Stichprobe, mit mindestens einer Substitution. Bezüglich der Substitutionen findet keine Selektion durch pFr2b statt. Siehe Figur 4.
20	Konstrukte mit ORF	Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Konstrukte mit einem offenen reversen Leserahmen.
25	Konstrukte mit ORF (%)	Prozentualer Anteil an Konstrukten in der Stichprobe mit einem offenen reversen Leserahmen. Man beachte, dass dieser Wert im Falle von pFr2b bei 100% liegt. Siehe Figur 2.
30	Konstrukte ohne InDels	Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Konstrukte ohne eine Insertion oder Deletion.
	Konstrukte ohne InDels (%)	Prozentualer Anteil an Konstrukten in der Stichprobe ohne Insertion oder Deletion. Man beachte, dass dieser Wert im Falle von pFr2b bei 87% liegt, also mehr als doppelt so hoch ist wie ohne entsprechende Selektion.
35	Korrekte Konstrukte	Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen

- 16 -

Konstrukte, die weder eine Insertion oder Deletion, noch eine Substitution haben - also zu 100% korrekt sind.

Korrekte Konstrukte (%)

5

Prozentualer Anteil an Konstrukten in der Stichprobe die weder eine Insertion oder Deletion, noch eine Substitution haben - also zu 100% korrekt sind. Man beachte, dass dieser Wert bei im Falle von pFr2b bei 87% liegt, also fast doppelt so hoch ist wie ohne entsprechende Selektion.

10

Siehe Figur 4.

Del >3 (Größe)

Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Deletionen > 3 bp und deren Größe.

Del 3 Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Deletionen von 3 bp.

15

Del 2 Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Deletionen von 2 bp.

Del 1 Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Deletionen von 1 bp.

Ins 1 Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Insertionen von 1 bp.

Ins 2 Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Insertionen von 2 bp.

Ins 3 Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Insertionen von 3 bp.

20

Ins >3 Gesamtzahl der in der Stichprobe gefundenen Deletionen > 3 bp.

Ergebnis:

25

Die Klonierung in den Selektionsvektor pFr2b führt im gegebenen Beispiel zu einer 100 %igen Eliminierung von Inserts, deren Leserahmen durch Insertionen oder Deletionen zerstört ist. Eine Selektion auf die weitaus selteneren Substitutionsmutationen findet jedoch nicht statt. Auch Insertionen/Deletionen, die den Leserahmen intakt lassen, werden nicht eliminiert.

30

Insgesamt führte die Selektion im gegebenen Beispiel zu einer Ausbeute von 78 % korrekter Konstrukte, während ohne Selektion nur 41 % der Konstrukte korrekt waren. Das Ergebnis der Untersuchung der Selektion ist in Figur 2 veranschaulicht.

35

Ansprüche

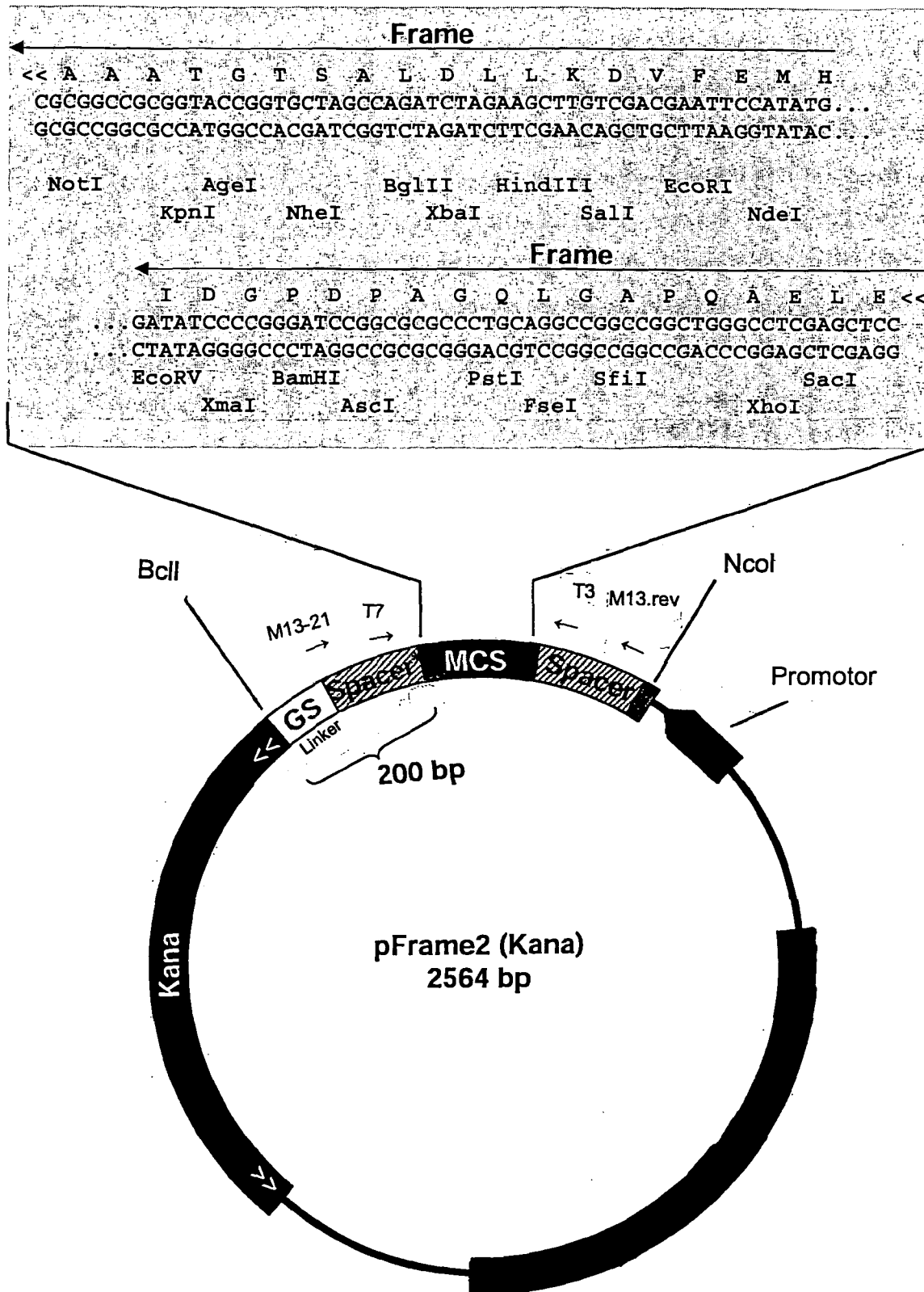
1. Verfahren zur Bestimmung von Frameshift-Mutationen in kodierenden
5 Zielnukleinsäuren, welches die Schritte umfasst:
 - (i) Bereitstellen einer Wirtszelle, umfassend eine doppelsträngige Nukleinsäure, welche eine kodierende Zielnukleinsäure und eine dazu komplementäre, kodierende Gegenstrangnukleinsäure umfasst, worin die Gegenstrangnukleinsäure in operativer
10 Verknüpfung mit einem Reportergen in 3' Position vorliegt;
 - (ii) Bewirken der Expression der Gegenstrangnukleinsäure; und
 - (iii) Bestimmen, ob in der Wirtszelle eine Expression des Reportergens erfolgt,
15 worin die Expression des Reportergens anzeigt, dass die Zielnukleinsäure keine Frameshift-Mutation aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Gegenstrangnukleinsäure
20 weiterhin in operativer Verknüpfung mit einer Expressionskontrollsequenz in 5'-Position vorliegt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, worin Schritt (i) umfasst:
Einbringen eines Expressionsvektors, umfassend die doppelsträngige Nukleinsäure, welche eine kodierende Zielnukleinsäure und eine dazu
25 komplementäre, kodierende Gegenstrangnukleinsäure umfasst, in eine Wirtszelle.
4. Verfahren nach Anspruch 3, worin die Gegenstrangnukleinsäure in dem
30 Expressionsvektor in operativer Verknüpfung mit einem Reportergen in 3' Position und/oder mit einer Expressionskontrollsequenz in 5' Position vorliegt.
5. Verfahren nach Anspruch 3, worin der Expressionsvektor zusammen mit einem Reportervektor, welcher das Reportergen umfasst, in die

Wirtszelle eingebracht wird.

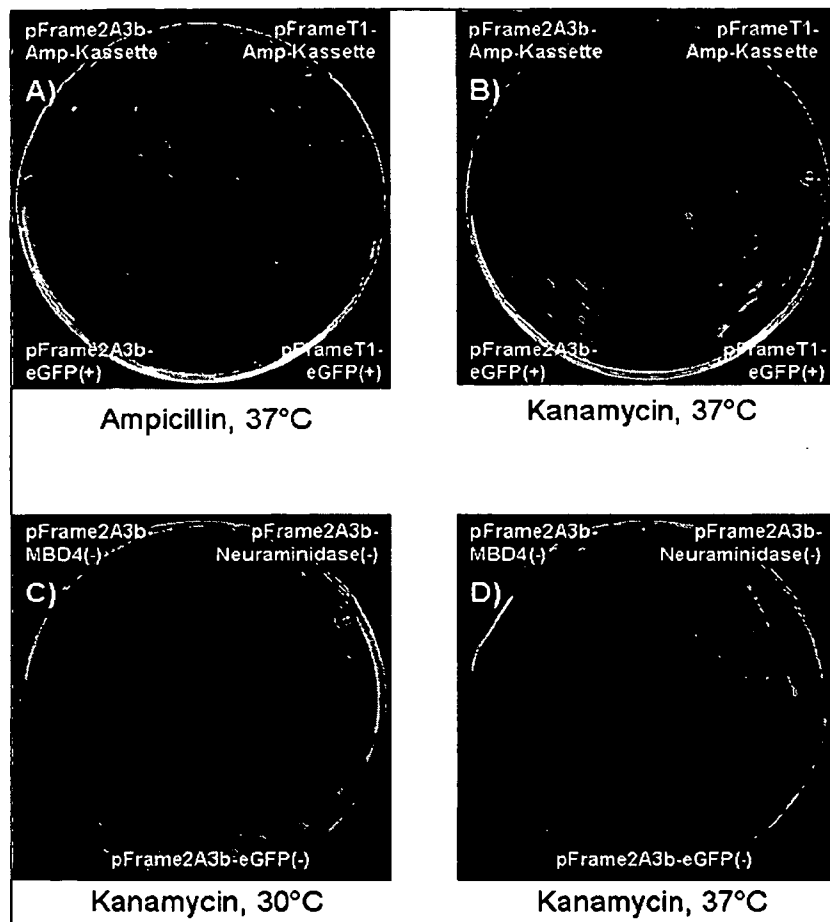
6. Verfahren nach Anspruch 3, worin der Expressionsvektor in eine Wirtszelle eingebracht wird, die bereits ein Reportergen enthält.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 6, worin in Schritt (i) ein Expressionsvektor verwendet wird, der zusätzlich mindestens ein Selektionsmarkergen umfasst.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 7, worin das Selektionsmarkergen konstitutiv exprimiert wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Gegenstrangnukleinsäure so optimiert wird, dass sie keine Stopp-
15 Kodons umfasst.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Nukleinsäuresequenz aus genomischen Sequenzen, cDNA-Sequenzen, oder cDNA-Fragmenten stammt.
20
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Nukleinsäuresequenz aus einer Bibliothek, die eine Kollektion von Sequenzen enthält, stammt.
- 25 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Zielnukleinsäuresequenz aus einer normalisierten cDNA-Bibliothek stammt.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin als
30 Expressionsvektor ein Plasmid verwendet wird.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin als Wirtszelle eine eukaryotische Zelle verwendet werden.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 - 14, worin das Einbringen des Expressionsvektors durch Calciumphosphat-Copräzipitation, Lipofektion, Elektroporation, Partikelbeschuss oder virale Infektion erfolgt.
- 5
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin das Reportergen ein für ein nachweisbares Genprodukt codierendes Gen enthält.
- 10
17. Verfahren nach Anspruch 16, worin das Reportergen ein Antibiotika-Resistenzgen wie etwa Kanamycin-Resistenz umfasst.
18. Verfahren nach Anspruch 16, worin das nachweisbare Genprodukt aus Fluoreszenzproteinen wie vorzugsweise GFP ausgewählt wird.
19. Verfahren nach Anspruch 16, worin das nachweisbare Genprodukt eine colorimetrisch messbare Reaktion katalysiert.
- 20
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, worin die Bestimmung in Schritt (iii) durch Fluoreszenzcytometrie oder Imaging-Assays erfolgt.

Figur 1



 mit 8 out-of-frame Stopps & ohne Met

Figur 2

Figur 3

A) eGFP(-) Sequenzkarte (reverse complement)

Oben: Translation 'des Minusstranges

Unten: Translation des Plusstranges (wt Protein)

1	E L K L V Q F I H A Q G N T S G G H E F Q Q H H V I T	
1	GAGCTCAAGCTTGTACAGTTCATCCATGCCAGGGTAATACCAGCGGCGGTACGAATTCAGCAGCACCATGTGATCAC	80
	CTCGAGTTCGAACATGTCAAGTAGGTACGGGTCCCATTTATGGTCGCCGCCAGTGTCTAAGGTCGTCGTGGTACACTAGTG	80
	L E L K Y L E D M G L T I G A A T V F E L L V M H D R	
81	F F V R I F A Q G A L G A Q V V V I R Q Q H R A I T	
81	GTTCCTCGGATCTTGTCTAGGGCGCTCTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTATCCGGCAGCAGCACCAGGGCCATCACCA	160
	CAAAAGCAAGCCTAGAAACGAGTCCCGCAGACCCACGAGTCCATACCAATAGGCCGTCGTCGTGGCCCGGTAGTGGT	160
	K E N P D K S L A S Q T S L Y H N D P L L V P G D G	
161	N R G V L L V V I G Q L H A A I F D V V A D F E V H F	
161	ATCGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGATCGGCCAGCTGCACGCTGCCATCTTCGATGTTGTGGCGGATTTGAAGTTCACCTT	240
	TAGCCCAACAAGACGACCATCACTAGCCGGTCGACGTGCGACGGTAGAAGCTACAACACCGCCTAAACTTCAAGTGAAA	240
	I P T N Q Q Y H D A L Q V S G D E I N H R I K F N V K	
241	D A V F L F I G H D V H V V A V V V V F Q F V A Q D V	
241	GATGCCGTTTTCTGTTTATCGGCCATGATGTACACGTGTGGCTGTGTAGTTGTATTCAGTTTGTGGCCAGGATGT	320
	CTACGGCAAAAGACAAATAGCCGGTACTACATGTGCAACACCGACAACATCAACATAAGGTCAAACACCGGGTCTTACA	320
	I G N K Q K D A M I Y V N H S N Y N Y E L K H G L I N	
321	T V L F K V D A F Q F D T V H Q G I A F E F H F G T	
321	TACCGTCTCTTTAAAGTCGATGCCTTTCAGTTCGATACGGTTCACAGGGTATCGCCTTCGAATTTCACTTCGGCACGG	400
	ATGGCAGGAGAAATTTTCAGCTACGGAAAGTCAAGCTATGCCAAGTGGTCCCATAGCGGAAGCTTAAAGTGAAGCCGTGCC	400
	G D E K F D I G K L E I R N V L T D G E F K V E A R	
401	G F V V A I I F E E N G T F L H V A F R H G A F E E I	
401	GTTCCTGATGTCATCTTTGAAGAAAATGTACGTTCTGACGTCAGCTTCGGCATGGCGCTTTTGAAGAAATC	480
	CAAAACATCAACGGTAGTAGAACTTCTTTTACCATGCAAGGACGTGCATCGGAAGGCCGTACCGCGAAAACCTCTTTAG	480
	T K Y N G D D K F F I T R E Q V Y G E P M A S K F F D	
481	V L F H V I R V A R E A L H A V G Q G G H Q G R P R H	
481	GTGCTGTTTCATGTATCGGGTAGCGAGAGAAGCACTGCACGCCGTAGGTACAGGTGGTCACAGGGTCGGCCACGGCA	560
	CACGACAAAGTACACTAGGCCCATCGCTCTCTTCGTGACGTGCGGCATCCAGTCCACAGTGGTCCCAGCCGGTGCCGT	560
	H Q K M H D P Y R S F C Q V G Y T L T T V L T P W P V	
561	R Q F A G G T D E F Q G G Q F A V G G I T F T F A G H	
561	CCGGCAGTTTGGCGGTGATCAGATGAATTCAGGGTCAGTTTGCCGTAGGTGGCATCACCTTCACCTTCGCCGGACAG	640
	GGCCGTCAAACGGCCACCATGTCTACTTAAAGTCCAGTCAAACGGCATCCACCGTAGTGAAGTGAAGCGGGCTGTGC	640
	P L K G T T C I F K L T L K G Y T A D G E G E G S V	
641	A E F V A V H I A I Q F H Q N R H H A G E Q F F A F G	
641	CTGAATTTGTGGCGGTTACATCGCCATCCAGTTCCACCAAGATCGGCACCGCGGTGAACAGTTCTTCGCTTTTGA	720
	GACTTAAACACCGCAAGTGTAGCGGTAGGTCAAGGTGGTCTTAGCCGTGGTGCAGGCACCTTGTCAAGAAGCGGAAACCT	720
	S F K H G N V D G D L E V L I P V V G T F L E E G K S	
721	H H M G T	
721	CACCATATGGGTACC	735
	GTGGTATACCATGG	735
	V M H T G	

B) Neuraminidase(-) Sequenzkarte (reverse complement)

Oben: Translation des Minusstranges

Unten: Translation des Plusstranges(wt protein)

1	E L T A A A L L F I N G K R Q F R A I R P A P A H G I	
1	GAGCTCACGGCTGCTGCTTATTATTTATCAATGGTAAACGGCAGTTCCGCGCCATCCGGCCAGCTCCAGCTCACGGTAT	80
1	CTCGAGTGCCGACGACGGAATAATAAATAGTTACCATTTGCCGTCAAGGCGCGGTAGGCCGGTTCGAGGTCGAGTGCCATA	80
	L E R S S G * * K D I T F P L E A G D P W S W S V T D	
81	A V H A A K A N A A A A G P N G A F F R T A T N Q F	
81	CGTGTTTACGCGCGCAAAAGCTAATGTGTGCTGCCGTGGTCCAAATGGTGCTTTCTTTTCGGACGGCCACGAATCAGTTCC	160
81	GCGACAAGTGGCGGCTTTTCGATTACGACGACGGCGACCAAGGTTTACCACGAAAGAAAGCCTGCCGGTGTCTAGTCAAGG	160
	S N V G C F S I S S G S T W I T S E K P R G R I L E	
161	H P K A R T N A I Q A G Q F R M L H K A A A I A A P I	
161	ACCCAAAAGCAGGACGAATCAATCCAGGCGGTCAGTTCCGGATGTGACAAAGCTGCCGTATAGCCGCTCCAATC	240
161	TGGGTTTTCTGTCCTGCTTACGTTAGGTCCGGCCAGTCAAGGCTACGACGTGTTTCGACGGCGATATCGGCGAGGTTAG	240
	V W F C P R I C D L G T L E P H Q V F S G S Y G S W D	
241	G N R H N I L F H A K A A I G A G P A V R I P N H F K	
241	GGTAATCGCCACAATATCCTGTTTCACGCTAAAGCTGTATCGGTGCCGGTCCAGCGGTTCCGATCCCAATCATTTCAA	320
241	CCATTAGCGGTGTTATAGGACAAAGTGCATTTCGACGATAGCCACGGCCAGGTCCGCAAGCCTAGGGTTTAGTAAAGTT	320
	T I A V I D Q K V S F S S D T G T W G N P D W I M E F	
321	A A T A V G A F G T A N P H A I A I F K A K A F H A	
321	AGCCGCTACGGCTGTGGTGCTTTTGGTACGGCCAATCCACACGCCATCGCCATATTTAAAGCTAAAGCCTTTCACGCCA	400
321	TCGGCGATGCCGACAACCACGAAACCATGCCGGTTAGGTGTGCGGTAGCGGTATAAATTCGATTTCGAAAGTGCGGT	400
	G S R S N T S K T R G I W V G D G Y K F S F G K V G	
401	I R A V R A H R A A A A G A I V R T R V I A K H A A A	
401	TACGCGCGTTTCGGGCTCATCGGGCCGACGTGCCGTGCCATCGTTCCGGACGCGGGTTATCGCCAAACACGCGCTGCA	480
401	ATGCGCGCAAGCCCGAGTAGCCCGGCTGACGGCCACGGTAGCAAGCCTGCGCCCAATAGCGGTTTGTGCGCGACGT	480
	Y A G N P S M P G C S G T G D N P R P N D G F V G S C	
481	N I A N L I F Q V L V K A H P R T V A A M P V I T A H	
481	AATATAGCCAATCTGATATCCAGGTTCTGGTTAAAGCTCACCCACGGACGGTTGCTGCCATGCCAGTTATCACGGCACA	560
481	TTATATCGGTTAGACTATAAGGTCCAAGACCAATTTAGGTGGGTGCTTGCCAACGACGGTACGGTCAATAGTGCCGTGT	560
	I Y G I Q Y E L N Q N F S V W P R N S G H W N D R C V	
561	A G N F A R I R I A A A F F I M I V R R I Q F H A F	
561	CGCAGGTAATTTCCGCCGCATCCGGATAGCAGCTGCATTCTTCATAATGATAGTTCCGGCGCATCCAGTTCCACGCTTTTC	640
561	GCGTCCATTAAAGCGGGCGTAGGCCTATCGTCGACGTAAGAAGTATTACTATCAAGCCGCGTAGGTCAAGGTGCGAAAAG	640
	C T I E G A D P Y C S C E E Y H Y N P A D L E V S K	
641	H H F A F F H F K N F I A R L A V A R A I G H H G K A	
641	ACCACTTTGCCTTTTTCATTTTAAAAATTTTATAGTTCGCTGGCCGTTGCTCGGGCCATCGGTATCACGGTAAAGCA	720
641	TGGTGAACGGAAAAAGTAAATTTTAAATATCGAGCGGACCGCAACGAGCCGGTAGCCAGTAGTCCATTTCGT	720
	V V K G K E M K F I K Y S A Q G N S P G D T M V T F C	
721	A A V H A R A F A F L G T Q N V V T P A F N G I G N N	
721	GCTCGGTTACGACACGCGCATTCGCTTTCTGGGTACGAGAAATGTTGTACGCCAGCTTTTAAATGGTATCGGTAATAA	800
721	CGACGGCAAGTGGTGGCGTAAGCGAAAGGACCCATGCGTCTTACAACAATGCGGTGCAAAATACCATAGCCATTATT	800
	S G N V C A C E S E Q T R L I N N R W S K I T D T I I	
801	A V I F Q H R H R A V I R A A N A N G Q P A G A I M	
801	TGCGGTTATATTTTCAGCACCGCCACCGCGCGTTATCCGGGCGCTAATGCCAATGGTCAGCCAGCTGGTGCCATCATGG	880
801	ACGGCAATATAAAGTCGTGGCGGTGGCGCGGCAATAGGCCCGCGGATTACGGTTACAGTCGGTCGACCGGTAGTACC	880
	G N Y K L V A V A G N D P G S I G I T L W S T G D H	

881 A R A R A P R H A F K T A V I R A R R F A H R A A H Q 960
881 CACGCGCTCGCGCTCCACGCCACGCTTTCAAACGGCTGTTATACGGGCTCGGCGCTTCGCCACCGGGCAGCTCATCAG 960
GTGCGCGAGCGCGAGGTGCGGTGCGAAAGTTTGGCGACAATATGCCGAGCCGCGAAGCGGGTGGCCGCTCGAGTAGTC
C A S A S W A V S E F R S N Y P S P A E G V P C S M L

961 G T M R A T I F H G A V A M F I V Q Q R A L G Q K K G 1040
961 GGTACGATGCGGGCTACGATCTTTCACGGTGCCGTTGCTATGTTTATCGTTACGACGCGCGCCCTGGGTGAGAAAAAGG 1040
CCATGCTACGCCGATGCTAGAAAGTGCCACGGCAACGATACAAATAGCAAGTCGTCGCGCGGGACCCAGTCTTTTTTCC
T R H P S R D K V T G N S H K D N L L A G Q T L F F T

1041 T A F Q M A A A N K R F T N H K H I A F A A N T N V 1120
1041 TACGGCATTCCAGATGGCTGCAGCTAATAACGGTTACGAATCACAACACATCGCCTTTGCTGCCAATACGAATGTTG 1120
ATGCCGTAAAGTCTACCGACGTCGATTATTGGCAAGTGCTTAGTGTGTTGTAGCGGAAACGACGGTTATGCTTACAAAC
R C E L H S C S I F P E R I V F V D G K S G I R I N

1121 V I F A M H R P A T N R A Q A A V A R Q G H A R H R F 1200
1121 TTATCTTTGCTATGCACCGCCAGCCAGCAATCGGGCACAGGCTGCTGTTGCCCGCAGGGTCACGCTCGCCACCGCTTT 1200
AATAGAAACGATACGTGGCGGGTCGGTGTAGCCCGTGTCGACGACAACGGGCGGTCCAGTGCAGCGGTGGCGAAA
N D K S H V A W G R I P C L S S N G A L T V S A V A K

1201 F G Q R V G V A N A F R L M L A A G L N A M A H P N A 1280
1201 TTCGGTCAGCGGGTGGTGTGCTAATGCTTTCCGCTGATGCTGGCTGCCGGTCTGAATGCTATGGCTCACCCAAATGC 1280
AAGCCAGTCGCCCAACCACAACGATTACGAAAGCGGACTACGACCGACGCCAGACTTACGATACCGAGTGGGTTTACG
E T L P N T N S I S E A Q H Q S G T Q I S H S V W I S

1281 N H V A N L Q H Q A H G A N H H A N A A N G N N F L 1360
1281 TAATCATGTTGCCAATCTGCAGCATCAGGCTCAGGTCAGGTCGAATCACCATGCAAATGCTGCCAATGGTAATAATTTCTGG 1360
ATTAGTACAACGGTTAGACGTCGTAGTCCGAGTGCCACGGTTAGTGGTACGTTTACGACGGTTACCATTTAAAAAGACC
I M N G I Q L M L S V T G I V M C I S G I T I I K Q

1361 V R V H G R T A T I T G T 1398
1361 TTCGGGTTTCATGGTCGACGGCCACGATAACGGGTACC 1398
AAGCCCAAGTACCAGCGTGCCGGTGCTATTGCCCATGG 1398
N P N M T A R G R Y R T G

C) MBD4(-) Sequenzkarte (reverse complement)

Oben: Translation des Minusstranges

Unten: Translation des Minusstranges (wt protein)

1 E L Q L L A Q A Q F F M V F P Q P I M I F V Q F M I F 80
1 GAGCTCCAGTTATTAGCTCAGGCTCAGTTTTTCATGGTTTCCACAGCCAATCATGATATTTGTTCAAGTTATGATCTT 80
CTCGAGGTCAATAATCGAGTCCGAGTCAAAAAGTACCAAAAGGTGTCGGTTAGTACTATAAACAAGTCAAACTAGAA
L E L * * S L S L K E H N E W L W D H Y K N L K H D E

81 R M H L F P F V H A K N T I A I V A I F A N A M Q F 160
81 CCGGATGCACCTGTTTCCATTGTTACGCAAAAAATACGATAGCTATCGTTGCCATATTTGCCAATGCCATGCAGTTCA 160
GGCCTACGTGGCAAGGTAAGCAAGTGCGTTTTTATGCTATCGATAGCAACGGTATAAACGGTTACGGTACGTCAAGT
P H V Q K W E N V C F I R Y S D N G Y K G I G H L E

161 N R I F P L F G Q I F I A K F H N G F R T Q I I Q A Q 240
161 ATCGGATATTTCCACTGTTTGGTCAGATATTCATCGCTAAATTTCAATGGTTTTCGCACGCAGATCATACAGGCCAG 240
TAGCCTATAAAGGTGACAAACAGTCTATAAGTAGCGATTAAAGTGTACCAAAAGCGTGCCTAGTATGTCGGGTC
I P Y K W Q K T L Y E D S F K V I T K A R L D Y L G L

241 R F Q Q F A H I T P I R G T R H F R A R I F F Q K F P 320
241 CGGTTTCAGCAGTTTCGCTCACATCAGCCCAATCCGCGGTACGCGCCACTTCCGCGCTCGGATATTTTCCAGAAATTCG 320
GCCAAAGTCGTCAAGCGAGTGTAGTGCGGTAGGCGCCATGCGCGGTGAAGGCGCGAGCCTATAAAAAGGTCTTTAAAG
P K L L E S V D R W D A T R A V E A S P Y K E L F K W

Q H G D G H L A A G P V Q K D G G D Q Q L P G V V E
321 ACAGCACGGGGATGGCCATCTTGCCGCTGGTCCGGTTCAGAAAGATGGTGGCGATCAGCAGCTTCAGGGGTCTGTGGAAC 400
321 TGTCTGTCCTTACCGGTAGAACGGCGACAGGCCAAGTCTTTCTACCACCGCTAGTCGTGAAGGTCCCAGCACCTTG 400
L V P I A M K G S T R N L F I T A I L L K W P D H F

Q G F L D Q V E G A S G G G P L L E G L P P G G A Q G
401 AGGGTTTCTGGACAGGTTGAAGGGGCTTCTGGGGGGGGTCCACTTCTGAAGGCCCTTCGCCCTGGGGGGGCTCAGGGC 480
401 TCCAAAGGACCTGGTCCAACCTCCCGAAGACCCCCCAGGTGAAGAACTTCCGGAAGCGGACCCCCCGAGTCCCG 480
L T E Q V L N F P S R P P T W K K F A K R R P P S L A

L F V V L A A E V Q A G L S P L D L G P G D G V L G E
481 CTCTTTGTGTACTTGTCTGAAGTACAGGCTGGTCTTTCTCCGCTCGATCTGGGTCCGGGGATGGTGTCTCTCGGTGA 560
481 GAGAAACAACATGAACGACGACTTCATGTCCGACCAGAAAGAGCGAGCTAGACCCAGGCCCTTACCACAGGAGCCACT 560
E K N Y K S S F Y L S T K R R E I Q T R P I T D E T F

V L P G G A A V V V H L A A P L Q D V G V Q V L F P
561 AGTCCTTCCGGGTGGGGCTGCAGTTGTGTCCATCTCGCTGCCCTTCTCAGGATGTGCGTGTGCAGGTGCTCTTTCCGC 640
561 TCAGGAAGGCCACCCGACGTCAACAACAGGTAGAGCGACGGGGAGAACTCTACAGCCACAGTCCACGAGAAAGGCG 640
D K R T P S C N N D M E S G R K L I D T H L H E K R

L H H L H L G A D F L A F Q E G V L V L L V V L A V L
641 TCCACCACCTCCACCTTGGTGCCGATTTCCTCGCTTTCCAGGAAGGTGTCTCTGACTTCTCGTTGTGTCTCGCTGTCTT 720
641 AGGTGTGTGAGGTGGAACACCGGCTAAAGGAGCGAAAGGTCTTCCACAGGAGCATGAAGAGCAACACGAGCGACAGGAA 720
E V V E V K T G I E E S E L F T D E Y K E N H E S D K

G A A E L V D D A A G F L L A A E V A A A A Q A P L F
721 GCGCTGCAGAACCTTGTGTATGATGCGCTGGTCTTCTGCTCGCTGCAGAGTGTCTGCCGCTGCTCAGGCTCCGCTCTT 800
721 CCGCGACGTCTTGAACAACCTACTACGGCGACCAAAAGACGAGCGACGTCTTCAACGACGGCGACGAGTCCGAGCGAGAA 800
A S C F K N I I G S T K Q E S C F N S G S S L S R E K

L L H Q A V F L A G H A Q C L A A G S G V A D A H G
801 TCTTCTTACCAGGCTGTTTTCTCGCTGGTCAAGCTCAGTGTCTCGCGCAGGCTCCGGCGTCTGATGACACAGGTC 880
801 AGAAGAAGTGGTCCGACAAAGGAGCGACAGTGCAGTACAGAGCGGCTCCGAGGCCGACGACTACGTGTGCCAG 880
K K V L S N E E S T V S L T E G C A G A D S I C V T

P V Q L A L L G H G L A L G V G L V A H G L P L A V A
881 CGGTCCAGTCTGGCTCTTCTGGGCCACGGGCTCGCTCTCGGCGTGGGCTTGTGACACGGACTCCCGCTTGTCTGCTGCT 960
881 GCCAGGTGCAGCGAGAACCGGTGCGCGAGCGAGAGCCGCGAGCGGAACAACGTGTGCTGAGGGGCAACGACAGCGA 960
R D L Q S K Q A V P E S E A D A K N C V S E R K S D S

L H E A A A A L P A A L L G F L D G D A L Q D G H L A
961 CTGCACGAAGCCGCTGCAGTCTTCTGTCAGCCCTTCTTGGTTTCTTGTATGGGGATGCCCTTCAGGATGGTCACTTGC 1040
961 GACGTGCTTGGCGACGTTCGAGAAGGACGTGCGGAAGAACCAAGAACTACCCCTACGGGAAGTCTTACCAGTGAACG 1040
Q V F G S C S K R C G K K T K K I P I G K L I T V K G

L G L P H F P E V H V V D A L I L F Q Q Q V G A G E
1041 CCTTGGGCTTCCGCACTTTCGGGAAGTTCAGTCTGTCAGCCCTCATCCTCTTTCAGCAGCAGGTGGGTGCTGGTGAAG 1120
1041 GGAACCCGAAGGTCAACGACAAACAGAGCAAGACGTCCACCCAGCTCCGCGAGTAGGAGAAAGTCTGCTCCACCCACGACCTTC 1120
K P K R V K R F N V D D V G E D E K L L L H T S T F

V A Q A P A F L Q F G A R A G G H E H V F L A L G P G
1121 TTGCTCAGGCCCCCTGCTTCTGTCAGTTCGGAGTATAGAGTGGGGGATGAACACGTCTTCTTGCAGTTCGACCGGGT 1200
1121 AACGAGTCCGGGACGAAAGGACGTCAAGCCTGATCTCGACCCCGCTACTTGTGAGAAAGAACGTGAACCTGGCCCA 1200
N S L G R S E Q L E S S S S P P M F V D K K C K S R T

P Q V P V A V V A L V L Q V A G Q G G H A A V L V P A
1201 CCGCAGGTTCAGTGTGTGTGTGCTCTGGTTCGACAGTGGCTGGTTCAGGGCGGCCATGCTGCAGTCTTGTACCGGC 1280
1201 GCGGTCCAAGGTCAACGACAAACAGAGCAAGACGTCCACCCAGTCCCGCGGTACGACGTACAGAAACAGTCCAGAACATGGCCG 1280
R L N W N S N N S Q N Q L H S T L A A M S C D K Y R S

7/8

1281 L D A P L G Q H G E V E V L G L Q A C L A V L V Q V
1281 TCCTTGATGCCCCGCTTGACAGCACGGTGAAGTCGAAGTCCTCGGGCTTCAGGCTTGTCTCGCCGTTCTTGTGCAGGTTAG 1360
1281 AGAACTACGGGCGGAACCTGTCGTGCCACTTCAGCTTCAGGAGCCCGAAGTCCGAACAGAGCGGCAAGAACACGTCATC 1360
K I G R K S L V T F D F D E P K L S T E G N K H L Y

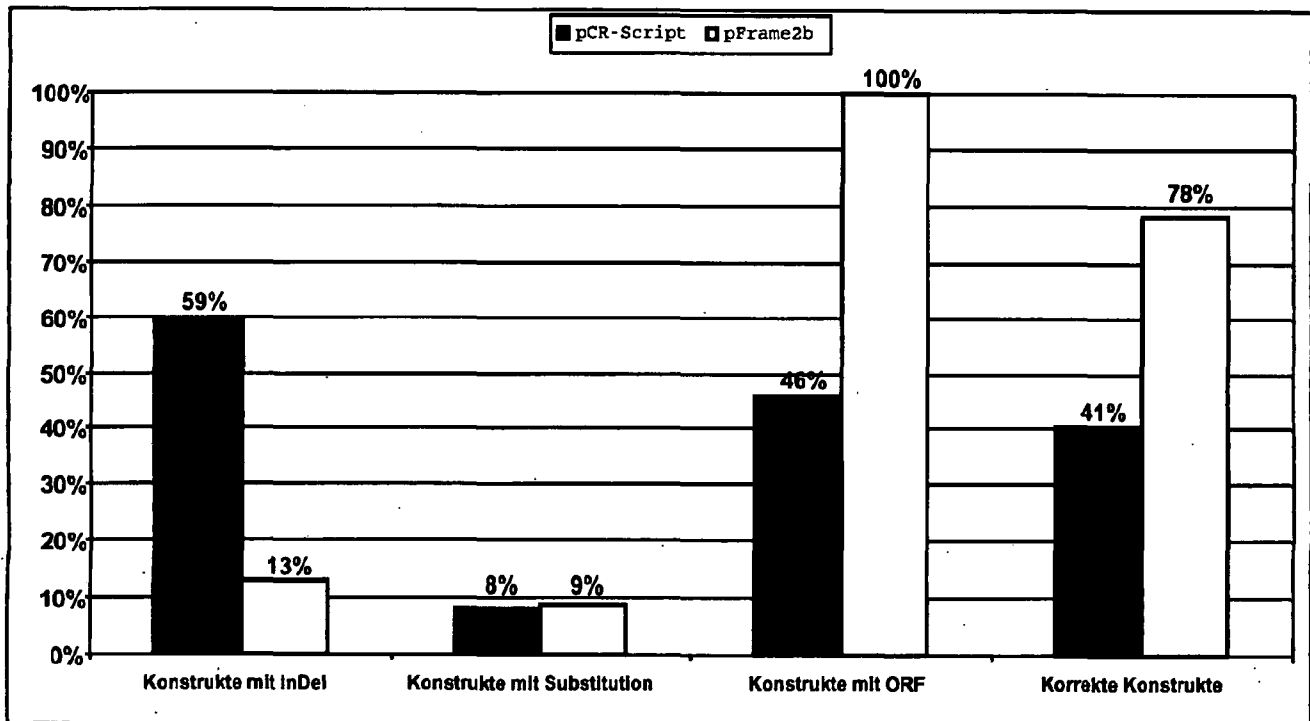
1361 V G Q A A L A S E L Q A L G A D E V H V E S A G G L A
1361 TTGGCCAGGCTGCTCTTGCTTCTGAACCTCAGGCCCTGGGGCTGATGAAGTACAGTCGAATCTGCCGGCGGTCTTGCC 1440
1361 AACCGGTCCGACGAGAACGAAGACTTGAAGTCCGGGACCCCGACTACTTCATGTGCAGCTTAGACGGCCGCCAGAACGG 1440
N A L S S K S R F K L G Q P S I F Y V D F R G A T K G

1441 E Q P L L H H P L P A A G H A L P T L G S G G G A E L
1441 GAACAGCCGCTGCTTACCACCCGCTCCAGCCGAGGGCAGGCTCTTCCGACACTCGGTTCCGGCGGTGGCGCCGAAC 1520
1441 CTTGTGCGCGACGAAGTGGTGGGCGAGGGTCGGCGTCCCGTGCAGAAAGGCTGTGAGCCAAGGCCGCCACCGCGGCTTGA 1520
F L R Q K V V R E W G C P V S K R C E T G A T A G F Q

1521 G A G D R F L Q Q G V A L A A P L D H H L F L V L A
1521 GGGCGCTGGCGATAGGTTCTGACAGAGGGGGTTGCACTCGCTGCTCCGCTTGATCATCATCTGTTCCTCGTCTCGCCC 1600
1521 CCCGCGACCGCTATCCAAGGACGTCGTCCCAACGTCAGCGACGAGGCGAACTAGTAGTAGACAAGGAGCAGGAGCGGG 1600
A S A I P E Q L L P N C E S S R K I M M Q E E D E G

1601 H S F Q F H G H I F L P Q V V G G V G H Q P L A A G H
1601 ACTCTTCCAGTTCATGGCCACATCTTCTTCCGAGGTCGTTGGGGGGTTCGGGCACCGAGCCGCTCGCTGCTGGTCAC 1680
1601 TGAGAAAGGTCAAGGTACCGGTGTAGAAGGAAGGCGTCCAGCAACCCCCAGCCCGTGGTCGGCGAGCGACGACGACGAGT 1680
V R E L E M A V D E K R L D N P P D P V L R E S S T V

1681 G R G G S A V A Q A Q A F Q A G G A H G G K L G T
1681 GGTAGGGGCGGCTCCGCGGTGCGCCAGGCTCAGGCTTTCCAGGCCGGTGGTGGCCATGGTGGCAAGCTTGGTACC 1755
1681 CCATCCCCGCGAGGCGCCAGCGGGTCCGAGTCCGAAAGGTCGGGCCACCGGGTACCACCGTTTCAACCATGG 1755
T P A A G R D G L S L S E L G T T G M T A L K T G

Figur 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/009223

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 872 560 A (SRL INC [JP]) 21 October 1998 (1998-10-21) cited in the application the whole document	1-8, 10-20
Y	RAK B ET AL: "INSERTION ELEMENT IS-5 CONTAINS A 3RD GENE" EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 3, no. 4, 1984, pages 807-812, XP002520783 ISSN: 0261-4189 the whole document	1-8, 10-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

Date of the actual completion of the international search

24 März 2009

Date of mailing of the international search report

06/04/2009

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Wimmer, Georg

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/009223

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KUMAMOTO C A ET AL: "Characterization of the Escherichia coli protein-export gene secB" GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 75, no. 1, 30 January 1989 (1989-01-30), pages 167-175, XP023544380 ISSN: 0378-1119 [retrieved on 1989-01-30] the whole document	1-8, 10-20
Y	MERINO ENRIQUE ET AL: "Antisense overlapping open reading frames in genes from bacteria to humans" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 10, 1994, pages 1903-1908, XP002520784 ISSN: 0305-1048 the whole document	1-8, 10-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/009223

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0872560	A	21-10-1998	AU 4471197 A	05-05-1998
			CA 2240018 A1	16-04-1998
			WO 9815654 A1	16-04-1998
			JP 3793237 B2	05-07-2006
			US 6682885 B1	27-01-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/009223

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12Q

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 872 560 A (SRL INC [JP]) 21. Oktober 1998 (1998-10-21) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-8, 10-20
Y	RAK B ET AL: "INSERTION ELEMENT IS-5 CONTAINS A 3RD GENE" EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, Bd. 3, Nr. 4, 1984, Seiten 807-812, XP002520783 ISSN: 0261-4189 das ganze Dokument	1-8, 10-20

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

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

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

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

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

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

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

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

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

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. März 2009

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/04/2009

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Wimmer, Georg

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/009223

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	KUMAMOTO C A ET AL: "Characterization of the Escherichia coli protein-export gene secB" GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 75, Nr. 1, 30. Januar 1989 (1989-01-30), Seiten 167-175; XP023544380 ISSN: 0378-1119 [gefunden am 1989-01-30] das ganze Dokument -----	1-8, 10-20
Y	MERINO ENRIQUE ET AL: "Antisense overlapping open reading frames in genes from bacteria to humans" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 22, Nr. 10, 1994, Seiten 1903-1908, XP002520784 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument -----	1-8, 10-20

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP2008/009223

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (April 2005)