



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 38 526 T2** 2009.03.26

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 975 745 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/00** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 38 526.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK97/00477**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 909 214.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/018905**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.10.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **07.05.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.02.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **20.02.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.03.2009**

(30) Unionspriorität:

119296	28.10.1996	DK
142696	13.12.1996	DK

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(72) Erfinder:

**BJOERNVAD, Mads Eskelund, DK-2880
Bagsvaerd, DK; SCHÜLEIN, Martin, DK-2880
Bagsvaerd, DK; JOERGENSEN, Per Lina, DK-2880
Bagsvaerd, DK**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler
Wichmann Huhn LLP, 81675 München**

(54) Bezeichnung: **EXTRAZELLULÄRE EXPRESSION VON ZELULOSE BINDENDEN DOMÄNEN (CBD) UNTER VERWENDUNG VON BACILLUS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen transformierten Bacillus-Wirt, der in der Lage ist, ein Cellulose-Bindedomäne-Polypeptid zu codieren, einen Bacillus-Expressionsvektor und ein Verfahren zur Produktion einer Cellulose-Bindedomäne in einer Bacillus-Wirtszelle.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Fokussierung auf die CBD als eine funktionelle Domäne hat die Synthese der Domäne als ein Einzeldomänenmolekül mit eingeschlossen. Eine der ersten reinen CBDs wurde erhalten, indem sie durch automatische Festphasensynthese (Kraulis P. et al. (1989) synthetisiert wurde.

[0003] Es wurde gezeigt, dass CBDs in E. coli als funktionelle Einzeldomänen exprimiert werden können, siehe z. B.: Ong E. et al. (1993), wo offenbart ist, dass die Expression in das Periplasma der Zellen unter Verwendung von E. coli zu einer Ausbeute von 33 mg CBD pro Liter Kulturflüssigkeit führt.

[0004] Neuerdings wurde auch eine Pilz-Doppel-CBD (ein Dimer) erfolgreich in E. coli exprimiert, siehe Linder M. et al. (1996).

[0005] WO 96/13524 offenbart modifizierte CBD Proteine, die in E. coli exprimiert werden.

[0006] Allerdings ist die Expression der CBDs in E. coli keine echte extrazelluläre Expression und führt zu einer unzufriedenstellenden Ausbeute, die für die großtechnische Produktion von CBD zu gering ist.

[0007] US 5,525,195, US 5,536,655, WO 91/17244 und WO 91/10732 offenbaren die Expression in einer Bacillus-Wirtszelle eines Endoglucanase-Enzyms, bei dem die katalytisch aktive Domäne operabel mit einer Cellulose-Bindedomäne verknüpft ist.

[0008] Demgemäß besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, ein Verfahren zur Produktion von CBD in einer hohen Ausbeute, vorzugsweise mittels einer herkömmlichen Fermentationstechnik, die die extrazelluläre Produktion der CBD umfasst, die wiederum die Verwendung von CBD bei industriellen Anwendungen wirtschaftlich machbar macht, bereitzustellen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Die Erfinder haben nun gefunden, dass die Produktion von Cellulose-Bindedomänen (CBDs) durch Expression in einem Bacillus-Wirt möglich ist.

[0010] Vor der vorliegenden Erfindung war die Expression einer CBD ohne eine katalytisch aktive Domäne im Bacillus sehr unerwartet, da erstens Cellulose-Bindedomänen bekanntlich Disulfid-Brücken enthalten und da sie zweitens potentiell dem Abbau durch Proteasen, die durch den Bacillus-Wirt produziert werden, unterliegen.

[0011] Demnach betrifft die vorliegende Erfindung in ihrem ersten Aspekt einen Bacillus-Wirt, der mit einem Vektor transformiert ist, der eine DNA-Sequenz umfasst, die eine Cellulose-Bindedomäne codiert und zur Expression der DNA-Sequenz in der Lage ist.

[0012] In einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung einen Bacillus-Expressionsvektor, der eine inserierte DNA-Sequenz trägt, die eine Cellulose-Bindedomäne trägt.

[0013] Weiterhin betrifft die Erfindung in ihrem dritten Aspekt ein Verfahren zur Herstellung eines Cellulose-Bindedomäne-Polypeptids in einer Bacillus-Wirtszelle, wobei das Verfahren die Schritte umfasst

– Wachsen lassen in einem Nährmedium unter Bedingungen, um Cellulose-Bindedomäne überzuproduzieren, von Bacillus-Wirtszellen, die mit einer Expressionskassette transformiert wurden, welche als funktionsfähig verbundene Bestandteile einschließt:

- a) eine regulatorische Region zur Initiation der Transkription und Translation,
- b) eine DNA-Sequenz, die das Cellulose-Bindedomäne-Polypeptid codiert,
- c) eine regulatorische Region zur Termination der Transkription und Translation, wobei die regulatorischen Regionen in dem Wirt funktionell sind,
- d) ein Selektionsmarkergen zum Selektionieren transformierter Wirtszellen; und

– Gewinnen des Cellulose-Bindedomäne-Polypeptids.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0014] Eine Cellulose-Bindedomäne (CBD) ist ein Polypeptid, das eine hohe Affinität gegenüber wasserunlöslichen Formen von Cellulose und Chitin, einschließlich kristalliner Formen besitzt oder an sie bindet.

[0015] CBDs kommen als integrale Teile von großen Proteinkomplexen vor, die aus zwei oder mehr verschiedenen Polypeptiddomänen bestehen, beispielsweise in hydrolytischen Enzymen (Hydrolasen, die typischerweise aus einer katalytischen Domäne bestehen, die die aktive Stelle für die Substrathydrolyse und eine Kohlehydrat-Bindedomäne oder Cellulose-Bindedomäne (CBD) zum Binden an die unlösliche Matrix enthält. Solche Enzyme können mehr als eine katalytische Domäne und ein, zwei oder drei CBDs und gegebenenfalls eine oder mehrere Polypeptidregionen umfassen, die die CBDs mit der (den) katalytischen Domäne(n) verknüpfen, wobei letztere Regionen in der Regel als ein „Linker“ bezeichnet werden. Beispiele für hydrolytische Enzyme, die eine CBD umfassen, sind Cellulasen, Xylanasen, Mannanasen, Arabinofuranosidasen, Acetylerasen und Chitinasen. CBDs wurden auch in Algen gefunden, z. B. in der Rotalge *Porphyra purpurea* als ein nicht-hydrolytisches Polysaccharide-Bindeprotein, siehe Peter Tomme et al. (1996). Allerdings stammen die meisten der bekannten CBDs aus Cellulasen und Xylanasen.

[0016] In diesem Zusammenhang soll der Begriff „Cellulose-Bindedomäne“ wie von Tomme et al., op. cit. definiert verstanden werden. Diese Definition klassifiziert mehr als 120 Cellulose-Bindedomänen in 10 Familien (I-X), die verschiedene Funktionen oder Rollen im Zusammenhang mit dem Mechanismus des Substratsbindens besitzen können. Während der Arbeit, die zu der vorliegenden Erfindung führt, wurde allerdings eine bisher unbekannte CBD-Familie gefunden, cf. Beispiel 8 nachstehend; und es wird vermutet, dass in der Zukunft neue Familienstellvertreter und zusätzliche CBD-Familien auftreten werden.

[0017] In dem Proteinkomplex ist typischerweise ein hydrolytisches Enzym, eine CBD, an dem N- oder C-Terminus lokalisiert oder ist intern.

[0018] Eine monomere CBD besteht typischerweise aus mehr als etwa 30 und weniger als etwa 250 Aminosäureresten. Beispielsweise besteht eine in Familie I klassifizierte CBD aus 33–37 Aminosäureresten; eine in Familie IIa klassifizierte CBD besteht 95–108 Aminosäureresten; und eine in Familie VI klassifizierte CBD besteht aus 85–92 Aminosäureresten. Demnach liegt das Molekulargewicht einer monomeren CBD typischerweise im Bereich von etwa 4 kD bis etwa 40 kD, und in der Regel unter etwa 35 kD.

[0019] CBDs können als ein Einzeldomänen-Polypeptid oder als ein Dimer, ein Trimer oder ein Polymer; oder als ein Teil eines Protein-Hybrids verwendbar sein.

Chimäre Protein-Hybride

[0020] Chimäre Protein-Hybride sind auf dem Fachgebiet bekannt, siehe z. B. WO 90/00609, WO 94/24158 und WO 95/16782, und umfassen eine Cellulose-Bindedomäne (CBD) aus einem anderen Ursprung, vorzugsweise aus einem anderen mikrobiellen Ursprung, als das Chimäre Protein als solches, wobei die CBD als ein integraler Teil des Proteins existiert. Typischerweise sind die Chimären Protein-Hybride Enzym-Hybride, das heißt, sie enthalten eine katalytische Domäne zusammen mit der Bindedomäne.

[0021] Chimäre Protein-Hybride und Enzym-Hybride können durch Transformieren eines DNA-Konstrukts, welches mindestens ein DNA-Fragment umfasst, das die Cellulose-Bindedomäne (CBD) codiert, welches, mit oder ohne einen Linker mit einer DNA-Sequenz ligiert ist, die das Protein oder Enzym codiert, in eine Wirtszelle hergestellt werden und durch Wachsenlassen der Wirtszelle, um das fusionierte Gen zu exprimieren. Das rekombinante Fusionsprotein oder die Enzym-Hybride können durch die folgende Formel beschrieben werden:

CBD-MR-X

[0022] Wobei CBD die N-terminale oder die C-terminale Region einer Aminosäuresequenz ist, die mindestens der Cellulose-Bindedomäne entspricht; MR die mittlere Region (der Linker), und eine Bindung oder eine kurze Verknüpfungsgruppe sein kann, vorzugsweise von etwa 2 bis etwa 100 Kohlenstoffatomen, stärker bevorzugt von zwei bis 40 Kohlenstoffatomen; oder vorzugsweise von etwa 2 bis etwa 100 Aminosäuren, stärker bevorzugt von 2 bis 40 Aminosäuren; und X eine N-terminale oder C-terminale Region eines Polypeptids ist, welches durch die DNA-Sequenz codiert wird, die das Protein oder Enzym codiert.

- [0023]** Das rekombinante Fusionsprotein oder die Enzym-Hybride mit einer internen CBD werden allerdings ebenfalls berücksichtigt.
- [0024]** Eine DNA-Sequenz, die eine CBD aus einem gegebenen Organismus codiert, kann herkömmlicherweise unter Anwendung der PCR-Techniken und auch auf der Grundlage der derzeitigen Erkenntnis erhalten werden, dass es möglich ist, homologe Sequenzen aus anderen Organismen zu finden.
- [0025]** Es wird davon ausgegangen, dass neue CBDs durch Klonieren von Cellulasen, Xylanasen oder einem anderen Pflanzenzellwand-Abbauenzym und durch Messen des Bindens an Cellulose gefunden werden können. Wenn die Enzymaktivität unter den nachstehend beschriebenen Standardbedingungen an Avicel gebunden ist, kann angenommen werden, dass ein Teil des Gens eine Bindedomäne codiert.
- [0026]** Nach Erhalt des DNA-Fragments, das eine CBD codiert, wird das DNA-Gen in einen Vektor inseriert, der für seine Expression in *Bacillus* spp geeignet ist.
- [0027]** Beispielsweise kann die Celluloseaffinität unter Verwendung von 10 g Avicel in einer 500 ml gepufferten Aufschlämmung (Puffer: 0,1 Natriumphosphat, pH 7,5) gemessen werden, welche langsam unter Verwendung eines Löffels gerührt und 30 Minuten bei Raumtemperatur quellen gelassen wird. Anschließend wird das Enzym in einem Verhältnis von 1 Teil Cellulose-Bindedomäne zu 150 Teilen Avicel zugesetzt. Dies erfolgt auf Eis, was innerhalb 5 bis 10 Minuten ein optimales Binden ergibt. Das Avicel kann sodann gewaschen und zur Sichtbarmachung der gebundenen Proteine direkt auf SDS-PAGE aufgebracht werden (da die Verwendung von SDS und Kochen die gebundenen Proteine freisetzen wird). Alternativ wird die Aufschlämmung in eine Säule gepackt und gewaschen. Das gebundene Protein wird eluiert, entweder in ionisiertem Wasser oder in einem Puffer mit hohem pH, wie Triethylamin (pH 11,2; 1% Lösung), wobei das pH-eluierte Protein schnell auf neutral eingestellt wird.
- [0028]** Mehrere CBDs wurden bereits in *E. coli* exprimiert, allerdings wurde nicht von einer Expression und Sezernierung aus *Bacillus* sp berichtet. *E. coli* besitzt als ein Expressionswirt für heterologe Proteine mehrere Vorteile gegenüber *Bacillus* spp., zum einen, da *E. coli* einen periplasmatischen Raum aufweist, wo ein ordnungsgemäßes Falten von heterologen exprimierten Genen möglich ist (zur Übersicht siehe beispielsweise Hockney, R. C. (1994)). Insbesondere das Oxidationspotential und die Existenz von Disulfid-Oxidoreductasen in dem Periplasma sind notwendig, wenn Proteine mit einer Funktionalität exprimiert werden, die von ordnungsgemäß angeordneten Disulfidbrücken abhängig ist. (Emmanuel Brun et al. (1995)). Überproduktion, Reinigung und Charakterisierung der Cellulose-Bindedomäne der *Erwinia chrysanthemi*-sezernierten Endoglucanase EGZ ist in *Eur. J. Biochem* 231, 142–148, und Ong et al., (1993) offenbart. Weitere Beispiele für CBDs mit Disulfid-Bindungen sind: die N-terminale CBD von Ce1B aus *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* (NCIMB 10462) (siehe den Abgleich in Tomme P. et al., op. cit., und die N-terminale CBD von CenA aus *Cellulomonas fimi* (ATCC 484), N. R. Gilkes et al. (1991).
- [0029]** Weiterhin wirkt das Periplasma von *E. coli* als Schutz des heterolog exprimierten Proteins gegenüber der Wirkung von Proteasen, die sowohl im Überstand als auch im Cytoplasma vorhanden sind.
- [0030]** Es ist auch bekannt, dass bei der Expression von sezernierten Proteinen mit Disulfidbrücken in *Bacillus subtilis* das Expressionsniveau signifikant abfällt. (van den Berg et al. (1993)).
- [0031]** Ein weiteres Problem bei heterologer Expression besteht im proteolytischen Abbau des exprimierten Proteins. *Bacillus subtilis* exprimiert bekanntlich mindestens 7 verschiedene extrazelluläre Proteasen (Hrsg. A. L. Sonenshein et al. (1993)).
- [0032]** Insbesondere für die CBDs, die sehr stark hydrophobe Proteine sind, könnte die Translokation des Proteins bei Expression in *Bacillus subtilis* schwerwiegend beeinträchtigt werden und infolge der nachteiligen Auswirkungen, wenn das Protein aufgrund seiner Hydrophobizität an der Zellmembran verankert wird, sogar den Zelltod herbeiführen.
- [0033]** In ihrem ersten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung einen *Bacillus*-Wirt, der mit einem Vektor transformiert ist, der eine DNA-Sequenz umfasst, die eine CBD codiert, und in der Lage ist, die Sequenz zu exprimieren. Offensichtlich besteht das exprimierte Polypeptid im Wesentlichen aus einer oder mehreren nicht katalytischen Domänen, d. h. das Polypeptid umfasst keine katalytisch aktive Domäne.
- [0034]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform besitzt die exprimierte CBD oder das CBD-enthaltende Poly-

peptid ein Molekulargewicht (Mw), das gleich oder höher ist als etwa 4 kD. Vorzugsweise ist das Mw gleich oder geringer als etwa 35 kD, stärker bevorzugt etwa 32 kD, noch stärker bevorzugt etwa 30 kD, insbesondere etwa 25 kD.

[0035] Die CBD kann in der Form eines Einzeldomänen-Polypeptids exprimiert werden, d. h. ein Polypeptid, das eine CBD umfasst. Alternativ kann die CBD in der Form eines Dimers oder Trimers oder sogar eines Polymers exprimiert werden, d. h. ein Polypeptid oder Protein, das zwei, drei oder sogar mehr als drei identische CBD-„Einheiten“ einschließt.

[0036] Die CBD kann auch als ein Teil eines Mehrdomänen-Polypeptids exprimiert werden, wobei der Nicht-CBD-Teil eines solchen Polypeptids beispielsweise eine, zwei oder sogar mehr Domänen ohne katalytische Aktivität ist.

[0037] Es wird angenommen, dass fast jede CBD erfindungsgemäß exprimiert werden kann, d. h. mittels eines transformierten Bacillus-Wirts. Vorzugsweise werden solche CBDs exprimiert, die aus einem Mikroorganismus oder einer Pflanze, stärker bevorzugt aus einem Bakterium oder aus einem Pilz, erhältlich sind.

[0038] Beispiele für CBDs aus Bakterien umfassen CBDs, die aus Spezies erhältlich sind, die zu einer der folgenden Arten gehören:

Butyrivibrio, Cellulomonas, Clostridium, Microbispora, Micromonospora, Pseudomonas, Streptomyces, Thermomonospora, Bacillus, Caldocellum, Erwinia, Myxococcus, Cellvibrio, Thermoanaerobacterium, und Thermotoga.

[0039] Beispiele für CBDs aus Pilzen umfassen CBDs, die aus Spezies erhältlich sind, die zu einer der folgenden Arten gehören: Agaricus, Dictyostelium, Fusarium, Humicola, Neocallimastix, Neurospora, Limulus, Penicillium, Phanerochaete, und Trichoderma.

[0040] Beispiele für CBDs, die aus Pflanzen erhältlich sind, sind CBDs aus Expansionen.

[0041] Der erfindungsgemäße Bacillus-Wirt ist ein neutralophiler, ein alkalophiler, ein mesophiler oder ein thermophiler Wirt.

[0042] Beispiele für Wirte, die bei der vorliegenden Erfindung geeignet sind, sind Wirte aus den Spezies Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus stearothermophilus, und Bacillus amyloliquefaciens. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass andere Bacillus-Spezies ebenfalls geeignete Wirte zur Expression von CBDs sein können.

[0043] Wie in weiteren Einzelheiten nachstehend beschrieben, wird der erfindungsgemäße Wirt mit einem Vektor transformiert, der eine CBD umfasst, der eine CBD-codierende DNA-Sequenz umfasst. Vorzugsweise ist der Vektor in ein Genom des Wirts integriert, stärker bevorzugt wurde er auf dem Genom amplifiziert.

[0044] Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Vektor als ein Expressionsplasmid, vorzugsweise ein Multikopienplasmid, vorhanden.

[0045] In einem zweiten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung einen Bacillus-Expressionsvektor, der eine inserierte CBD-codierende DNA-Sequenz trägt. Vorzugsweise umfasst die Expressionskassette des Vektors regulatorische Regionen aus einem Bacillus sp., stärker bevorzugt sind solche regulatorische Regionen endogen zu dem Wirt.

[0046] In einem dritten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Produktion eines CBD-Polypeptids, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

– Wachsen lassen in einem Nährmedium unter Bedingungen, um Cellulose-Bindedomäne überzuproduzieren, von Bacillus-Wirtszellen, die mit einer Expressionskassette transformiert wurden, welche als funktionsfähig verbundene Bestandteile einschließt:

- a) eine regulatorische Region zur Initiation der Transkription und Translation,
 - b) eine DNA-Sequenz, die das Cellulose-Bindedomäne-Polypeptid codiert,
 - c) eine regulatorische Region zur Termination der Transkription und Translation, wobei die regulatorischen Regionen im Wirt funktionell sind, und
 - d) ein Selektionsmarker-Gen zum Selektionieren transformierter Wirtszellen; und
- Gewinnen des Cellulose-Bindedomäne-Polypeptids.

[0047] In ihrem vierten Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Optimierung der CBD-Expression in einem Bacillus-Wirt, wobei das Verfahren die Schritte der Expression in dem Wirt einer an ein Reporter-molekül fusionierten CBD; und das Aufzeichnen der Konzentration der exprimierten CBD in den Überstand des fermentierten Wirts durch Messen der natürlichen Eigenschaft oder der natürlichen Eigenschaften des Reporter-moleküls umfasst.

[0048] Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist das Reporter-molekül ein Green Fluorescent Protein, und die natürliche Eigenschaft ist die Fluoreszenzemission.

[0049] In ihrem fünften und sechsten Aspekt betrifft die Erfindung ein Polypeptidhybrid, bestehend im Wesentlichen aus einer oder mehreren Cellulose-Bindedomänen, die an ein Green Fluorescent Protein fusioniert sind, und ein Verfahren der Produktion eines solchen Hybrids durch Expression in einem Bacillus-Wirt, Wachstum des transformierten Wirts unter Bedingungen, wobei die transformierte Kultur im Wesentlichen frei von untransformierten Zellen ist; Inkubation der transformierten Kultur in einem Nährmedium, wobei das Hybrid überproduziert wird; und Gewinnen des Hybrids.

EXPRESSION EINER CBD

Rekombinante Expressionsvektoren

[0050] Ein rekombinanter Vektor, der ein DNA-Konstrukt umfasst, das die erfindungsgemäße CBD codiert, kann jeder beliebige Vektor sein, der zweckmäßigerweise DNA-Rekombinationsverfahren unterzogen werden kann, und die Wahl des Vektors hängt oft von der Wirtszelle ab, in die er eingebracht werden soll. Das Einbringen des Vektors in die Wirtszelle wird oft als die transformierte Wirtszelle bezeichnet. Eine solche Transformation gibt die Einführung von DNA in eine Wirtszelle unter Verwendung z. B. von Protoplasten, natürlichen kompetenten Zellen, Transfektion, Konjugation, Elektroporation, oder von jedem gleichwertigen Verfahren an. Somit kann der Vektor ein autonom replizierender Vektor sein, d. h. ein Vektor, der als extrachromosomale Einheit existiert, dessen Replikation von der chromosomalen Replikation unabhängig ist, z. B. ein Plasmid.

[0051] Alternativ kann der Vektor ein Vektor sein, der beim Einbringen in einer Wirtszelle in das Wirtszellen-Genom zum Teil oder in seiner Gesamtheit integriert und zusammen mit dem (den) Chromosom(en), in die er integriert worden ist, repliziert wird.

[0052] Der Vektor ist vorzugsweise ein Expressionsvektor, in dem die DNA-Sequenz, die die erfindungsgemäße CBD codiert, funktionsfähig mit zusätzlichen Segmenten verknüpft ist, die zur Transkription der DNA erforderlich sind. Im Allgemeinen stammt der Expressionsvektor von Plasmid- oder Virus-DNA ab oder kann Elemente von beiden enthalten. Der Begriff „funktionsfähig verknüpft“ gibt an, dass die Segmente so angeordnet sind, dass sie für ihre beabsichtigten Zwecke konzentriert funktionieren, z. B. startet die Transkription in einem Promotor und verläuft über die DNA-Sequenz, die die CBD codiert.

[0053] Der Promotor kann jede beliebige DNA-Sequenz sein, die transkriptionale Aktivität in der Wirtszelle der Wahl zeigt, und kann von Genen stammen, die Proteine codieren, die für die Wirtszelle entweder homolog oder heterolog sind.

[0054] Beispiele für geeignete Promotoren zur Verwendung in bakteriellen Wirtszellen umfassen den Promotor des Bacillus-stearothermophilus-maltogenen Amylase-Gens, des Bacillus-licheniformis-Alpha-Amylase-Gens, des Bacillus-amyloliquefaciens-Alpha-Amylase-G-Gens, des Bacillus-subtilis-alkalinischen Protease-Gens oder des Bacillus pumilus-Xylosidasegens, oder den Phagen Lambda P_R- oder P_L-Promotoren oder die E. coli-Promotoren lac, trp oder tac.

[0055] Alternativ ist die Konstruktion von Integrationsvektoren so möglich, dass die DNA, die die CBD codiert, nur funktionell exprimiert wird, wenn sie ordnungsgemäß in das Wirtsgenom integriert ist, z. B. stromabwärts von einem residenten Promotor.

[0056] Die DNA-Sequenz, die die erfindungsgemäße CBD codiert, kann, sofern notwendig, auch mit einem geeigneten Terminator funktionsfähig verknüpft sein.

[0057] Der erfindungsgemäße rekombinante Vektor kann weiterhin eine DNA-Sequenz umfassen, die es dem Vektor ermöglicht, in der in Frage kommenden Wirtszelle zu replizieren.

[0058] Der Vektor kann auch einen selektierbaren Marker, z. B. ein Gen, dessen Produkt einen Defekt in der Wirtszelle komplementiert, oder ein Gen, das Resistenz gegenüber z. B. Antibiotika, wie Kanamycin, Chloramphenicol, Erythromycin, Tetracyclin, Spectinomycin oder dergleichen oder Resistenz gegenüber Schwermetallen oder Herbiziden codiert, einschließen.

[0059] Um eine erfindungsgemäße CBD auf den sekretorischen Weg der Wirtszellen zu lenken, kann eine sekretorische Signalsequenz (auch als Leader-Sequenz, Prepro-Sequenz oder Pre-Sequenz bekannt) in dem rekombinanten Vektor bereitgestellt sein. Die sekretorische Signalsequenz ist mit der DNA-Sequenz verknüpft, die die CBD in dem korrekten Leseraster codiert. Sekretorische Signalsequenzen sind allgemein 5' zu der DNA-Sequenz, die die CBD codiert, positioniert. Die sekretorische Signalsequenz kann diejenige sein, die normalerweise mit der CBD assoziiert ist, oder kann aus einem Gen stammen, das ein anderes sezerniertes Protein codiert.

[0060] Die Verfahrensweisen, die zur Ligation der DNA-Sequenzen, die die vorliegende CBD codieren, verwendet werden, der Promotor und gegebenenfalls der Terminator und/oder die sekretorische Signalsequenz oder die Verfahrensweisen, die zum Zusammenfügen dieser Sequenzen durch geeignete PCR-Amplifikationschemata, und zu ihrer Insertion in geeignete Vektoren, die die Information enthalten, die zur Replikation oder Integration notwendig sind, verwendet werden, sind den Fachleuten gut bekannt. (cf., z. B., Sambrook et al., op. cit.).

[0061] Das Green Fluorescent Protein (GFP) ist zu einem breit eingesetzten Reportermolekül zur Aufzeichnung der Genexpression, für Tracer von Zellabstammungen und als Fusions-Marker für Proteine geworden (Cramer et al. (1996); Cubitt et al. (1995); International Patent Application PCT/DK96/00051).

[0062] GFP könnte an CBDs fusioniert sein, um ein Fusionsprotein mit der Cellulose-Bindeeigenschaft sowie den Fluoreszenz-Eigenschaften zu erzeugen. Die Expression dieses Fusionsproteins könnte zur Aufzeichnung der Expression von CBDs in Bacillus-Spezies verwendet werden und könnte dadurch zur Optimierung der Expressionsniveaus von gegebenen CBDs verwendet werden.

BEISPIELE

MATERIALIEN UND METHODEN

Stämme:

Bacillus agaradherens NCIMB Nr. 40482 umfasst das Endoglucanase-Enzym, das die DNA-Sequenz von Beispiel 8 codiert.

E. coli: SJ2 (Diderichsen, B. et al. (1990)) Elektrokompente Zellen, die unter Verwendung eines Bio-Rad-Genepulser™ hergestellt und transformiert wurden, wie von dem Hersteller empfohlen.

B. subtilis PL2306. Dieser Stamm ist der *B. subtilis* DN1885 (Diderichsen, B. et al. (1990)), gespalten in die transkriptionale Einheit des bekannten *Bacillus subtilis*-Cellulase-Gens, was zu Cellulase-negativen Zellen führt. Weiterhin wurde der Stamm in die *aprE*- und *nprE*-Gene gespalten (*aprE*: Stahl and Ferrari (1984)) und (*nprE*: Yang et al (1984)). Die Aufspaltungen wurden im Wesentlichen wie in (Hrsg. Sonenshein et al. (1993), p. 618) beschrieben durchgeführt.

B. subtilis PL2304. Dieser Stamm ist der *B. subtilis* Stamm DN1885 (Diderichsen, B., op. Cit.), gespalten in die transkriptionale Einheit des *Bacillus subtilis* Cellulase-Gens, was zu Cellulase-negativen Zellen führt. Die Aufspaltung wurde im Wesentlichen wie in (Hrsg. A. L. Sonenshein, op cit.) beschrieben durchgeführt. *B. subtilis* ToC46 (Diderichsen, B. et. al., op. cit.).

Plasmide:

pMB100, welches ein Derivat von pDN1528 ist (S. Jorgensen et al. (1991)). Das Plasmid ist im Wesentlichen das gleiche wie pDN1528, allerdings wurde eine *SacI*-Schnittstelle zu Klonierungszwecken zwischen das Stop-Codon des *amyL*-Gens und seinem Terminator eingebaut.

pDN1981 (P. L. Jorgensen et al. (1990))

Lösungen/Medien

TY- und LB-Agar (wie beschrieben bei Ausubel, F. M. et al., 1995).

SB: 32 g Trypton, 20 g Hefeextrakt, 5 g NaCl und 5 ml 1 N NaOH werden in sterilem Wasser bis auf Endvolu-

men von 1 Liter vermischt. Die Lösung wird durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C sterilisiert.
 10% Avicel: 100 g Avicel (FLUKA, Schweiz) werden mit sterilem Wasser bis zu einem Endvolumen von 1 Liter vermischt, und das 10% Avicel wird durch Autoklavieren für 20 min bei 121°C sterilisiert.
 Stammlösung von Kongorot (SIGMA, USA). 1% in ionisiertem Wasser.
 Puffer: 0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,5.

Allgemeine molekularbiologische Verfahren:

DNA-Manipulationen und -Transformationen wurden unter Verwendung der molekularbiologischen Standardverfahren durchgeführt (Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NV; Ausubel, F. M. et al., 1995; Harwood und Cutting, 1990).

[0063] Enzyme für DNA-Manipulationen wurden nach den Beschreibungen der Hersteller eingesetzt.

[0064] Primern eingesetzt wurden, um die DNA-Fragmente zu erhalten, die die CBDs aus den drei unterschiedlichen Bakterien codieren.

[0065] Gleichzeitig wurden PCR-Primer konstruiert, um Extra-Codons hinzuzufügen, entsprechend den Aminosäuren, die der Signal-Sequenz von amyL vorangehen, welche verwendet wird, um die CBDs zum Äußeren der Bacillus-subtilis-Zelle zu lenken.

[0066] In-vitro-Amplifikation der CBD von Cellulomonas-fimi(ATCC 484)-Cellulase CenA Ungefähr 100 bis 200 ng genomische DNA wurde in PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% (w/v) Gelatine), enthaltend 200 µM von jedem dNTP, 1,5% DMSO (SIGMA, USA), 2,5 Einheiten von AmpliTaq-Polymerase (Perkin-Elmer, Cetus, USA) und 100 pmol von jedem Primer:

CELLFIMO1U,

5'- CTG CCT CAT TCT GCA GCA GCG GCG GCA AAT CTT AAT GCT CCC GGC
 TGC CGC GTC GAC TAC -3'

CELLFIMO1D,

5'- CTG CCT CAT TGC ATG CAG AGC TCC TAC TAC ACG GTG CCC GTG CAG
 GTG GTG -3'

PCR-amplifiziert.

[0067] Die Restriktionsstellen PstI und SacI sind unterstrichen.

[0068] Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung eines DNA-Thermal-Zyklers (Landgraf, Deutschland) durchgeführt. Eine Inkubation bei 94°C für 5 min und anschließende Durchführung von dreißig PCR-Zyklen unter Verwendung eines Zyklusprofils mit Denaturierung bei 94°C für 1 min, Annelieren bei 65°C für 1 min, und Extension bei 72°C für 1 min. Zehn-µl-Aliquote des Amplifikationsprodukts wurden durch Elektrophorese in 1,5%-Agarose-Gelen (NuSieve, FMC) mit ReadyLoad 100 bp DNA-Leiter (GibcoBRL, Denmark) als ein Größenmarker analysiert.

In-vitro-Amplifikation der CBD von Pseudomonas fluorescens (NCIMB10462) CelB

[0069] Ungefähr 100 bis 200 ng genomische DNA wurde in HiFidelity™-PCR-Puffer (Boehringer Mannheim, Deutschland), angereichert mit 200 µM von jedem dNTP, 2,6 Einheiten von HiFidelity™ Expand Enzymgemisch und 300 pmol von jedem Primer:

PSUPPER,

5'- CGT CCT CAT TCT GCA GCA GCG GCG GCA AAT CTT AAT GCA GCA GTG
 TGT GAA TAT CGG G -3'

PSLOWER,

5'- CTG CCT CAT TGC ATG CAG AGC TCC TAC TAT TGT CCA CCG CAA ATC
GCC -3'

PCR-amplifiziert.

[0070] Die Restriktionsstellen PstI und SacI sind unterstrichen.

[0071] Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung eines DNA-Thermal-Zyklers (Landgraf, Deutschland) durchgeführt. Eine Inkubation bei 94°C für 2 min, 30 sec bei 60°C und 45 sec bei 72°C und anschließende Durchführung von zehn PCR-Zyklen, unter Verwendung eines Zyklusprofils mit Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Annelieren bei 60°C für 30 sec, und Extension bei 72°C für 45 sec und zwanzig PCR-Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 sec, 60°C für 30 sec und 72°C für 45 sec (bei diesem Elongationsschritt wurden 20 sec zu jedem Zyklus hinzugefügt). Zehn-µl-Aliquote des Amplifikationsprodukts wurden durch Elektrophorese in 1,5%-Agarose-Gelen (NuSieve, FMC) mit ReadyLoad 100 bp DNA-Leiter (GibcoBRL, Denmark) als ein Größenmarker analysiert.

In-vitro-Amplifikation des CBD-Dimers von Clostridium stercorarium (NCIMB 11754) XynA

[0072] Ungefähr 100 bis 200 ng genomische DNA wurde in HiFidelity™-PCR-Puffer (Boehringer Mannheim, Deutschland), angereichert mit 200 µM von jedem dNTP, 2,6 units von HiFidelity™ Expand Enzymgemisch und 300 pmol von jedem Primer:

CLOST03U,

5'- CTG CCT CAT TCT GCA GCA GCG GCG GCA AAT CTT AAT CCA ACT CCT
GCC CCA TCT CAA AGC -3'

CLOST03D2,

5'- CTG CCT CAT TGC ATG CAG AGC TCC TAC TAC CAG TCA ACA TTA ACA
GGA CCT GAG-3'

PCR-amplifiziert.

[0073] Die Restriktionsstellen PstI und SacI sind unterstrichen.

[0074] Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung eines DNA-Thermal-Zyklers (Landgraf, Deutschland) durchgeführt. Eine Inkubation bei 94°C für 2 min, 30 sec bei 60°C und 45 sec bei 72°C und anschließende Durchführung von zehn PCR-Zyklen unter Verwendung eines Zyklusprofils mit Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Annelieren bei 60°C für 30 sec und Extension bei 72°C für 45 sec und zwanzig PCR-Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 sec, bei 60°C für 30 sec und bei 72°C für 45 sec (bei diesem Elongationsschritt wurden 20 sec zu jedem Zyklus hinzugefügt). Zehn-µl-Aliquote des Amplifikationsprodukts wurden durch Elektrophorese in 1,5%-Agarose-Gelen (NuSieve, FMC) mit ReadyLoad 100 bp DNA-Leiter (GibcoBRL, Denmark) als ein Größenmarker analysiert.

Klonieren durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

Subklonieren von PCR-Fragmenten

[0075] Vierzig-µl-Aliquote der PCR-Produkte, die wie vorstehend beschrieben erzeugt wurden, wurden unter Verwendung eines QIAquick-PCR-Purification-Kit (Qiagen, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA wurde in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert, Fünfundzwanzig µl des aufgereinigten PCR-Fragments wurden mit SacI und PstI verdaut, in 1,5% Agarose mit niedriger Geliertemperatur

(SeaPlaque GTG, FMC)-Gelen elektroforesiert, die relevanten Fragmente wurden aus den Gelen ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, USA) nach den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Das isolierte DNA-Fragment wurde anschließend an PstI-, SacI-verdautes pMB100 ligiert, und das Ligationsgemisch wurde zur Transformation von *B. subtilis* PL2306 verwendet.

Identifizierung und Charakterisierung von positiven Klonen

[0076] Die Zellen wurden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die Chloramphenicol (6 µg/ml), 0,4% Glucose und 10 mM Kaliumhydrogenphosphat enthielten, und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Kolonien wurden am nächsten Tag wieder auf frische LBP-G-Chloramphenicol-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Einzelkolonien am nächsten Tag von jedem Klon wurden in flüssiges LB-Medium, das Chloramphenicol (6 µg/ml) enthielt, übergeführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln bei 250 U/min inkubiert.

[0077] Die Plasmide wurden aus den flüssigen Kulturen unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Purification Mini Kit (Qiagen, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert, allerdings wurde der Resuspensionspuffer mit 1 mg/ml Hühnereiweiß-Lysozym (SIGMA, USA) vor der Lyse der Zellen bei 37°C für 15 min angereichert. Fünf-µl-Proben der Plasmide wurden mit PstI und SacI verdaut. Die Restriktionsverdauungen wurden durch Gel-Elektrophorese auf einem 1,5%-Agarose-Gel (NuSieve, FMC) überprüft. Das Auftreten eines DNA-Fragments der gleichen Größe wie aus der PCR-Amplifikation gesehen, gab einen positiven Klon an. Drei Klone wurden selektiert, die jeweils eine CBD aus den drei verschiedenen vorstehend erwähnten Bakterien darstellten: MB 144 (exprimiert *C. fimi* CenA-CBD) und MB203 (exprimiert *C. stercorarium* XynA-Dimer-CBD) und MB207 (exprimiert *P. fluorescens* ssp *cellulosa* CelB-CBD).

Nukleotid-Sequenzieren des klonierten DNA-Fragments

[0078] Qiagen-aufgereinigte Plasmid-DNA wurde mit dem Taq Deoxy Terminal Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, USA) unter Verwendung der gleichen Primer wie vorstehend verwendet und unter Verwendung eines Applied Biosystems 373A Automatik-Sequenzierers nach den Anweisungen des Herstellers sequenziert. Die Analyse der Sequenzdaten wird nach bekannten Verfahren durchgeführt.

Expression, Sekretion und Funktionsanalyse der klonierten CBDs

[0079] Die Klone MB 144 (exprimiert *C. fimi* CenA-CBD), MB203 (exprimiert *C. stercorarium* XynA-Dimer-CBD) und MB207 (exprimiert *P. fluorescens* ssp *cellulosa* CelB-CBD), wurden alle 20 h in SB-Medium bei 37°C und 250 U/min inkubiert. 1 ml zellfreier Überstand wurde mit 200 µl 10% Avicel vermischt. Das Gemisch wurde 1 h zur Inkubation bei 0°C stengelassen. Nach diesem Binden von CBD an Avicel wurde das Avicel mit CBD 5 min bei 5000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl SDS-Page-Puffer resuspendiert, 5 min bei 95°C gekocht, bei 5000 g 5 min zentrifugiert, und 25 µl wurden auf 18% Laemmli Tris-Glycin, SDS-PAGE NOVEX Gel (Novex, USA) geladen. Die Proben wurden in einer Xcell™-Mini-Zelle (NOVEX, USA) wie vom Hersteller empfohlen elektroforesiert, und sämtliche anschließenden Behandlungen der Gele, einschließlich Färben mit Comassie, Entfärben und Trocknen wurden wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt.

[0080] Das Auftreten von Proteinbanden der erwarteten Größen (MB144-Proteinbande ca. 12 kDa), (MB203-Proteinbande ca. 35 kDa) und (MB207-Proteinbande ca. 12 kDa) gab die Expression in *B. subtilis* von funktionellen CBDs an.

BEISPIEL 4

Expression und Reinigung von CBD-Dimer, das aus *C. stercorarium* kloniert wurde.

[0081] Plasmid, das aus MB203 isoliert wurde, wurde zur Transformation eines weiteren *Bacillus subtilis* ToC46 verwendet, und somit ein neuer CBD-Dimer-exprimierender Klon MB206 erhalten. Unter Verwendung dieses Stamms als Expressionswirt für das CBD-Dimer wurde der Klon in Schüttelkolben inkubiert, die SB-Medium (6 µg/ml Chloramphenicol) 20 h bei 37°C und Schütteln bei 250 U/min inkubiert.

[0082] 1400 ml Kulturfluid-Überstand wurden auf einem Eisbad gekühlt. Er wurde über ein Whatman Glasfilter F filtriert, und anschließend über ein 0,45 Micron Millipore Typ HVLP steril filtriert.

[0083] 50 Gramm Avicel wurden in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,5, bei Raumtemperatur 30 min suspendiert. Der Überstand wurde entfernt, und die Avicel-Aufschlammung wurde auf 4°C abgekühlt. Der klare

Überstand wurde mit der Avicel-Aufschlammung 30 min bei 4°C vermischt.

[0084] Das Avicel wurde 10 min absetzen gelassen und der Überstand entfernt. Der Avicel-Proteinkomplex wurde in eine Säule gepackt und mit 0,1 M Natriumphosphat-Puffer und anschließend mit Puffer, der 0,5 M Natriumchlorid einschloss, gewaschen. Schließlich wurde die CBD durch deionisiertes Wasser eluiert.

[0085] Insgesamt wurden 78 ml, die CBD enthielten, eluiert. Die CBD wurde nach Zugabe von festem Natriumchlorid auf einer Amiconzelle mit einer R81P-Membran mit einer Ausschlussgrenze von 8 kD bis auf eine Endkonzentration von 0,5 M konzentriert.

[0086] Die konzentrierte CBD-Lösung (30 ml) besaß eine Extinktion bei 280 nm von 1,2. Der molare Extinktionskoeffizient von MB 206 betrug 42000, entsprechend einer Proteinkonzentration von 0,82, was zu insgesamt 25 mg hoch aufgereinigter, Doppel-CBD führte. Auf der Grundlage von SDS-PAGE besaß das Ausgangsmaterial etwa 0,1 mg pro ml 29 kD. Das aufgereinigte Endprodukt zeigte nur eine einzige Bande auf SDS-PAGE.

BEISPIEL 5

Charakterisierung einer dimerisierten Pilz-CBD, kloniert und exprimiert in *Bacillus subtilis*

[0087] Ein CBD-Dimer von Pilzursprung wird durch Fusionieren der CBD, die von der DNA-Sequenz von *Humicola insolens* EGII codiert wird, mit der CBD, die von der DNA-Sequenz von 43 kDa aus *Humicola insolens* codiert wird, konstruiert.

[0088] Die DNA-Sequenz, die *Humicola insolens* EGII CBD codiert, und Linker werden aus dem Plasmid, das die cDNA von EG II, die auch als CMC 3 (Dalbøge and Heldt Hansen, 1994), unter Verwendung von Primern, die für die CBD-Region spezifisch sind, PCR-amplifiziert, und weiterhin wird der Antisense-Primer so konstruiert, dass dem PCR-Fragment ein Überhang verliehen wird, der identisch zu dem DNA-Fragment ist, der die vorhergehende CBD codiert, die CBD, die von dem Gen der 43 kDa Endoglucanase aus *H. insolens* codiert wird, die ausführlich in EP-B-0 531 372 und US 5,457,046 beschrieben ist. Die DNA, die diese CBD codiert, wird aus genomischer DNA der in EP-B-0 531 372 beschriebenen *Humicola insolens* PCR-amplifiziert.

[0089] Die beiden Fragmente werden durch SOE-PCR (Higuchi et al. (1988)) unter Verwendung der Primer:

Nr. 22857

5'- CTG CCT CAT TCT GCA GCA GCG GCG GCA AAT CTT AAT CAG GGC GGT
GCA TGG CAG CAG-3'

und des Primers

Nr. 20622

5'- CTG CCT CAT TGC ATG CAG AGC TCC TAC TAC AGG CAC TGA TGG TAC
CAG TC-3'

kombiniert.

[0090] Dieses PCR-Fragment wird, als ein PstI-SacI-Fragment, an pMB100 ligiert, und das Ligationsgemisch wird zur Transformation von *Bacillus subtilis* PL2306 verwendet.

[0091] Die klonierte DNA, die im Wesentlichen CBD-Dimer codiert, kann in der Sequenz CBD-EGII-CZ (327bp):

**GCAAATCTTA ATCAGGGCGG TGCATGGCAG CAGTGTGGTG GCGTTGGCTT
CTCGGGCTCT ACGTCGTGTG TGTCCGGTTA CACGTGCGTG TACTTGAACG ACTGGTA-
CAG CCAATGCCAG CCGCAGCCGA CGACGTTACG GACAACAACA ACGCCAGGGG
CAACATCGAC AACAAAGTCA GCCCCGGCTG CCACTTCAAC CACTCCGGCC
GGCTGCACTG CTGAGAGGTG GGCTCAGTGC GGC GGCAATG GCTGGAGCGG CTGCAC-
CACC TGCCTCGCTG GCAGCACTTG CACGAAGATT
AATGACTGGT ACCATCAGTG CCTGTAG**

und in der entsprechenden Aminosäure-Sequenz (108 aa Reste):

**ANLNQGGAWQ QCGGVGFSGS TSCVSGYTCV YLNDWYSQCQ PQPTTLRTTT
TPGATSTTRS APAATSTTPA GCTAERWAQC GGNGWSGCTT CVAGSTCTKI NDWYHQCL**

gefunden werden.

[0092] Expression, Sekretion und Funktionalität der CBD sind wie vorstehend beschrieben gekennzeichnet.

BEISPIEL 6

Konstruktion der GFP-CBD-Fusion zur CBD-Expressionsoptimierung

[0093] Ungefähr 100 ng Plasmid-DNA pMB144, das Plasmid wird wie vorstehend beschrieben isoliert, werden in PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% (w/v) Gelatine), enthaltend 200 µM von jedem dNTP, 1,5% DMSO (SIGMA, USA), 2,5 Einheiten AmpliTaq-Polymerase (Perkin-Elmer, Cetus, USA) und 100 pmol von jedem Primer:

C-Fusion1:

5'- GTC AGT GAA TTC GCA TGC GTC CTT CTT TGT GCT TG-3'

C-Fusion2:

5'- CTC ATA AAG CTT ACG GTG CCC GTG CAG GTG GTG-3',

amplifiziert.

[0094] Die Restriktionsstellen EcoRI und HindIII sind unterstrichen.

[0095] Die PCR-Reaktionen werden unter Verwendung eines DNA-Thermal-Zyklers (Landgraf, Deutschland) durchgeführt. Eine Inkubation bei 94°C für 5 min und anschließende Durchführung von dreißig PCR-Zyklen unter Verwendung eines Zyklusprofils mit Denaturierung bei 94°C für 1 min, Annelieren bei 60°C für 1 min, und Extension bei 72°C für 1 min. Zehn-µl-Aliquote des Amplifikationsprodukts werden durch Elektrophorese in 0,7% Agarose-Gelen (NuSieve, FMC) mit ReadyLoad 100 bp DNA-Leiter (GibcoBRL, Dänemark) als Größenmarker analysiert.

[0096] Das Fragment wird aufgereinigt, mit EcoRI und HindIII verdaut, Gel-aufgereinigt und mit dem Vektor pBR322 (Bolivar et al. (1977), Gene, 2, 95–113.) ligiert.

[0097] Das Ligationsgemisch wird zur Transformation von SJ2-elektrokompetenter E. coli. verwendet.

Identifizierung und Charakterisierung von positiven Klonen

[0098] Die transformierten Zellen werden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, die Ampicillin (200 µg/ml) enthalten und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden die Kolonien durch Wiederausstreichen von diesen auf frische LB-Ampicillin-Agar-Platten gewonnen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Einzelkolonien am zweiten Tag von jedem Klon werden in flüssiges LB-Medium übergeführt, das Ampicillin (200 µg/ml)

enthält, und über Nacht bei 37°C unter Schütteln bei 250 U/min inkubiert.

[0099] Die Plasmide werden aus den Flüssigkulturen unter Verwendung von QIAGEN Plasmid Purification Mini Kit (Qiagen, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Fünf- μ l-Proben werden mit HindIII und EcoRI verdaut. Die Restriktionsverdauungen werden durch Gel-Elektrophorese auf einem 0,7%-Agarose-Gel (NuSieve, FMC) überprüft.

[0100] Ein Derivat von GFP wird aus der DNA-Konstruktion der Mutante F64L-S65T-GFP kloniert, welche wie in der internationalen Patentanmeldung PCT/DK96/00051 konstruiert wurde.

[0101] Das DNA-Fragment, das die F64L-S65T-GFP codiert, wird als ein BamHI-HindIII-Fragment im Raster mit der CBD-codierenden DNA, die in pBR322 kloniert wird, kloniert. Die Ligation, Transformation und Identifizierung eines positiven Klons erfolgen im Wesentlichen wie vorstehend beschrieben.

[0102] Diese Fusionskonstruktion wird als ein EcoRI-BamHI-Fragment aus dem E. coli-Vektor in den Vektor pUB110 übergeführt (Gryczan et al. (1978)). Bacillus subtilis PL2306 wird transformiert und positive Klone werden durch ihre Fähigkeit zur Fluoreszenz und durch die Existenz eines Avicel-bindenden F64L-S65T-GFP-CBD-Fusionspolypeptids identifiziert.

[0103] Die Wellenlänge des zur Anregung des F64L-S65T-GFP verwendeten Lichts dieser Studie beträgt 488 nm, dieses aktiviert das F64L-S65T-GFP zur Emission von Licht bei 510–530 nm.

[0104] Die Fluoreszenz des Überstands wird durch Fluoreszenz-Spektroskopie gemessen und mit der Fluoreszenz des Überstandes nach Inkubation mit Avicel verglichen. Weiterhin kann das Fluoreszenzmolekül mit CBD durch Binden des Fusionsproteins an Avicel, Entfernen von überschüssigem Überstand und Überführen des Avicels in Küvetten zur Fluoreszenzmessung in einen Fluoreszenz-Spektrophotometer sichtbar gemacht werden.

[0105] Durch Vornehmen serieller Verdünnungen des Avicel-gebundenen oder nicht gebundenen Fusionsproteins kann das Expressionsniveau bestimmt werden, wodurch die Identifizierung eines Bacillus-Klons möglich gemacht wird, der relativ höhere Mengen an CBD exprimiert.

BEISPIEL 7

Screening unter Verwendung CMC-Kongorot

[0106] Rekombinante Bacillus-Klone, die CBDs exprimieren, können mittels des Expressionsniveaus der CBD gescreent werden.

[0107] Um Bacillus-Stämme zu finden, die zur Expression einer gegebenen CBD optimal sind, werden die Klone von Interesse in einem geeigneten Medium inkubiert, z. B. wie vorstehend in TV beschrieben, und bei entsprechenden Wachstumsbedingungen 24 h inkubiert. Der Überstand der Klone wird auf Agarose-CMC-Kongorot-Platten mit ausgestanzten Löchern übergeführt, der Überstand mit der CBD wird an die CMC 5 h bei 37°C binden gelassen. Nach dem Waschen für 15 min mit 2% NaCl-Lösung kann die CBD-Aktivität als eine Clearing-Zone gesehen werden.

[0108] Der Platten-Assay kann wie nachstehend beschrieben kombiniert werden.

[0109] Die Präparation des Gels zur Verwendung im CBD-Platten-Assay: 0,5% CMC und 0,7% Agarose (CMC; Carboxymethylcellulose, 7LF von Hercules) (Agarose; Litex HSA/HSB) werden durch Befeuchten der CMC und Agarose mit 96% Alkohol hergestellt. 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH-7,5, wird zugesetzt und das Gemisch auf 100°C bis zur vollständigen Auflösung erhitzt. Die Lösung wird auf 60°C abkühlen gelassen. Kongorot-Stammlösung wird bis zu einer Endkonzentration von 5% zugesetzt, und die Platten werden mit 15 ml auf eine Petri-Schale mit 9 cm Durchmesser gegossen.

[0110] Die Probenapplikationslöcher werden mit einem Stanzgerät hergestellt.

BEISPIEL 8

Identifizierung einer neuen CBD, die eine neue CBD-Familie definiert

[0111] Die alkalische Cellulase, die in *Bacillus subtilis*, wie nachstehend beschrieben, kloniert ist, wurde durch Inkubation des Klons für 20 h in SB-Medium bei 37°C und 250 U/min exprimiert. Es wurde gezeigt, dass die exprimierte Cellulase eine CBD enthält, durch ihre Fähigkeit, spezifisch an Avicel zu binden.

[0112] Beim Stehenlassen zur Inkubation für weitere 20 h wurde die Cellulase proteolytisch gespalten, und zwei spezifische Proteinbanden traten auf SDS-Page auf, wobei eine den katalytischen Teil des ungefähren Molekulargewichts (MW) von Cellulase von 35 kD und die andere einem vorgeschlagenen Linker und CBD von ungefähr MW 8 kD entsprach.

[0113] Es wurde gefunden, dass die CBD der terminale Teil der Cellulase ist und dass die CBD nicht mit einer der zuvor beschriebenen CBD-Familien (Tomme et al., 1995, p. 142–161) übereinstimmt. Demgemäß ist diese CBD das erste Element einer neuen Familie.

Klonieren der alkalischen Cellulase aus *Bacillus agaradherens* und Expression der alkalischen Endoglucanase in *Bacillus subtilis*

[0114] Die Präparation des Gels zur Verwendung im CBD-Platten-Assay: 0,5% CMC und 0,7% Agarose (CMC; Carboxymethylcellulose, 7LF von Hercules) (Agarose; Litex HSA/HSB) werden durch Befeuchten der CMC und Agarose mit 96% Alkohol hergestellt. 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH-7,5, wird zugesetzt und das Gemisch auf 100°C bis zur vollständigen Auflösung erhitzt. Die Lösung wird auf 60°C abkühlen gelassen. Kongorot-Stammlösung wird bis zu einer Endkonzentration von 5% zugesetzt, und die Platten werden mit 15 ml auf eine Petri-Schale mit 9 cm Durchmesser gegossen.

[0115] Die Probenapplikationslöcher werden mit einem Stanzgerät hergestellt.

BEISPIEL 8

Identifizierung einer neuen CBD, die eine neue CBD-Familie definiert

[0116] Die alkalische Cellulase, die in *Bacillus subtilis*, wie nachstehend beschrieben, kloniert ist, wurde durch Inkubation des Klons für 20 h in SB-Medium bei 37°C und 250 U/min exprimiert. Es wurde gezeigt, dass die exprimierte Cellulase eine CBD enthält, durch ihre Fähigkeit, spezifisch an Avicel zu binden.

[0117] Beim Stehenlassen zur Inkubation für weitere 20 h wurde die Cellulase proteolytisch gespalten, und zwei spezifische Proteinbanden traten auf SDS-Page auf, wobei eine den katalytischen Teil des ungefähren Molekulargewichts (MW) von Cellulase von 35 kD und die andere einem vorgeschlagenen Linker und CBD von ungefähr MW 8 kD entsprach.

[0118] Es wurde gefunden, dass die CBD der terminale Teil der Cellulase ist und dass die CBD nicht mit einer der zuvor beschriebenen CBD-Familien (Tomme et al., 1995, p. 142–161) übereinstimmt. Demgemäß ist diese CBD das erste Element einer neuen Familie.

Klonieren der alkalischen Cellulase aus *Bacillus agaradherens* und Expression der alkalischen Endoglucanase in *Bacillus subtilis*

[0119] Die Nucleotid-Sequenz, die die alkalische Cellulase aus *Bacillus agaradherens* (Hinterlegungsnr. NCIMB 40482) codiert, wurde durch PCR zum Einbringen in ein Expressionsplasmid pDN1981 kloniert.

[0120] Die PCR wurde im Wesentlichen, wie vorstehend beschrieben, auf 500 ng genomischer DNA unter Verwendung der folgenden beiden Primer, enthaltend die NdeI- und KpnI-Restriktionsstellen, zum Einbringen der Endoglucanase-codierenden DNA-Sequenz in pDN1981 zur Expression durchgeführt:

Primer 5: (Nr. 20887)

5'- GTA GGC TCA GTC ATA TGT TAC ACA TTG AAA GGG GAG GAG AAT CAT
GAA AAA GAT AAC TAC TAT TTT TGT CG -3'

Primer 6: (Nr. 21318)

5'- GTA CCT CGC GGG TAC CAA GCG GCC GCT TAA TTG AGT GGT TCC CAC
GGA CCG-3'

[0121] Nach PCR-Cycling wurde das PCR-Fragment unter Verwendung eines QIAquick PCR Column Kit (Qiagen, USA) nach den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA wurde in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, eluiert. Verdaut mit NdeI und KpnI, aufgereinigt und mit verdautem pDN1981 ligiert. Das Ligationsgemisch wurde zur Transformation von *B. subtilis* PL2304 verwendet. Kompetente Zellen wurden hergestellt und wie von Yasbin et al. (1975) beschrieben transformiert.

Isolierung und Test von *Bacillus subtilis*-Transformanten

[0122] Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agar-Platten, die 10 mg/ml Kanamycin, 0,4% Glucose, 10 mM KH₂PO₄ und 0,1% AZCL HE-Cellulose (Megazyme, Australien) enthalten, ausgestrichen und bei 37°C 18 h inkubiert. Endoglucanase-positive Kolonien wurden als Kolonien identifiziert, die von einer blauen Halo umgeben waren.

[0123] Jede der positiven Transformanten wurde in 10 ml TV-Medium, das 10 mg/ml Kanamycin enthielt, übergeimpft. Nach 1 Tag Inkubation bei 37°C, 250 U/min wurden 50 ml Überstand entnommen. Die Endoglucanase-Aktivität wurde durch Zugabe von 50 ml Überstand zu den Löchern, die in dem Agar der LB-Agar-Platten ausgestochen waren, die 0,1% AZCL HE-Cellulose enthielten, bestimmt.

[0124] Nach 16 h Inkubation bei 37°C gaben blaue Halo, die die Löcher umgaben, die Expression der Endoglucanase in *Bacillus subtilis* an.

BEISPIEL 9

Assay zum Selektieren der CBDs

Herstellung von Phosphorsäure-gequollener Cellulose (PASC):

[0125] 5 g Avicel wird mit Wasser befeuchtet und zu 150 ml eiskalter 85%iger Phosphorsäure zugesetzt und auf einem Eisbad 1 h schwach gerührt. Anschließend werden 500 ml kaltes Aceton unter Rühren zugesetzt. Das gequollene Avicel (PASC) wird über einen Glasfilter-Trichter filtriert und 3 Mal mit 100 ml eiskaltem Aceton und anschließend 2 Mal mit 500 ml Wasser gewaschen. Das PASC wird anschließend in 500 ml Wasser suspendiert und bis zur Homogenität unter Verwendung eines Ultra Thorax Homogenisators gemischt. Das PASC wird kalt gelagert.

CBD-Binden an Phosphorsäure-gequollene Cellulose (PASC)-Selektion der CBDs:

[0126] 400 ml 10 mg/ml PASC (hergestellt wie vorstehend beschrieben und mit 50 mM Natriumphosphat, pH 7, gewaschen) in 50 mM Natriumphosphat, pH 7, in Eppendorf-Röhrchen wurden mit 400 ml Cellulose-Bindedomäne (Ce15A CBD oder MB206 Doppel-CBD), verdünnt in 50 mM Natriumphosphat, pH 7, gemischt. Die Konzentration der CBD wurde variiert, z. B. von 0 mM bis ungefähr 8 mM für die CBD Ce15A. Eine Kontrollreihe wurde ohne PASC eingeschlossen. Die Proben wurden 1 h bei Raumtemperatur vor dem Zentrifugieren der Proben für 4 min bei 14000 g inkubiert. 500 µl des Überstandes wurden in 2 ml Wasser verdünnt. Die Menge an CBD, die in dem Überstand vorhanden war (freie CBD) wurde anschließend durch Tryptophan-Fluoreszenz-Spektroskopie auf einem Perkin-Elmer LS50 Lumineszenz-Spektrometer (Anregung bei 280 nm und Emission bei 340 nm) unter Verwendung der Fluoreszenzintensität der Proben ohne PASC-Zugabe als Referenz (Standardkurve) gemessen. Die Menge an gebundener CBD wurde dann wie folgt berechnet: Gesamt CBD (ohne PASC-Zugabe) – freie CBD. Somit wurde eine Bindungsisotherme durch Auftragen der Menge an gebundener CBD pro g PASC als Funktion von freier CBD in Lösung in mM, wie in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigt, erhalten. Die Daten konnten unter Verwendung eines einfachen Langmuir-Bindungsmodells angepasst werden (Bothwell et al., 1995): $E(\text{gebunden}) = (A_{\text{max}} \cdot E(\text{frei})) / (K_d + E(\text{frei}))$, wobei $E(\text{gebunden})$ die Menge an gebundener CBD in mmol/g PASC und $E(\text{frei})$ die Menge an freier CBD in mM ist. A_{max} ist die maximale Menge an CBD, die an PASC gebunden werden kann, und K_d ist die Gleichgewichtskonstante für das Gleichgewicht $E(\text{gebunden}) \ll E(\text{frei})$. Je geringer die K_d (Desorptionskonstante) ist, desto stärker ist somit die Bindung. Die-

se Konstanten werden nach Anpassen der Daten an das Modell unter Verwendung der Algorithmen in Graph-Pad Prism erhalten. Die Desorptionskonstanten, die für Ce15A CBD und MB206 Doppel-CBD gefunden werden, betragen 0,42 bzw. 0,76 mM (cf. [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#)).

[0127] Die erfindungsgemäßen CBDs zeigen Desorptionskonstanten unter 1 mM, stärker bevorzugt unter 0,1 mM und am stärksten bevorzugt unter 10 mM.

Literaturliste

- Bothwell, M. K. und Walker, L. P. (1995) *Bioresource Technology* 53: 21–29
- Kraulis P., G. M. Clore, M. Nilges, T. A. Jones, G. Pettersson, J. Knowles and A. M. Gronenborn, 1989, "Determination of the three-dimensional structure of the C terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing" in *Biochemistry* 28: 7241–7257.
- Ong E., N. R. Gilkes, R. C. Miller und D. G. Kilburn, 1993, "The cellulose-binding domain (cbdcex) of an exoglucanase from *Cellulomonas fimi* – production in *Escherichia coli* and characterization of the polypeptide" in *Biotechnology and Bioengineering*. 42: 401–409.
- Linder M., I. Salovuori, L. Ruohonen und T. T. Teeri, 1996, "Characterization of a double cellulose-binding domain – synergistic high-affinity binding to crystalline cellulose" in *Journal of Biological Chemistry* 271: 21268–21272.
- Peter Tomme et al. "Cellulose-Binding Domains: Classification and Properties" in "Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates", John N. Saddler and Michael H. Penner (Eds.), ACS Symposium Series, No. 618, 1996.
- Hockney, R. C. (1994) *TIBTECH*, Bd. 12, p. 456–463.
- Emmanuel Brun et al. (1995). *Eur. J. Biochem* 231, 142–148.
- N. R. Gilkes et al. (1991) *Eur. J. Biochem*, 202: 367–377.
- Bertus van den Berg et al., (1993), Introduction of disulfide bonds into *Bacillus subtilis* neutral protease. *Protein Engineering*, Bd. 6 Nr. 5, S. 521–527.
- Hrsg. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch und Richard Losick (1993) *Bacillus subtilis* and other Gram-Positive Bacteria, American Society for microbiology, S. 939 und S. 618.
- Andreas Cramer et al. (1996) Improved Green Fluorescent Protein by molecular evolution using DNA shuffling, *Nature Biotechnology*, Bd. 14, S. 315–319.
- Andrew B. Cubitt et al. (1995) Understanding, improving and using fluorescent proteins, *TIBS*, Bd. 20. S. 448–455.
- Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sjøholm, C. (1990) Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from *Bacillus brevis*. *J. Bacteriol.*, 172, 4315–4321.
- Stahl, M. L. und E. Ferrari (1984) Replacement of the *Bacillus subtilis* subtilisin structural gene with an *In vitro*-derived deletion mutation. *J. Bacteriol.* 158: 411–418.
- Yang, M. Y. et al (1984) Cloning of the neutral protease gene of *Bacillus subtilis* and the use of the cloned gene to create an *in vitro*-derived deletion mutation. *J. Bacteriol.* 160: 16–21.
- S. Jørgensen et al. (1991) *Journal of Bacteriology*, Bd. 173, No., S. 559–567.
- P. L. Jørgensen, C. K. Hansen, G. B. Poulsen und B. Diderichsen (1990) *In vivo* genetic engineering: homologous recombination as a tool for plasmid construction, *Gene*, 96 S. 37–41.
- Ausubel, F. M. et al. (Hrsg.) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995
- Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY.
- Harwood, C. R., und Cutting, S. M. (eds.) "Molecular Biological Methods for *Bacillus*". John Wiley and Sons, 1990.
- Pitcher, D. G., Saunders, N. A., Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8, 151–156).
- Dalbøge, H. und H. P. Heldt Hansen. 1994. A novel method for efficient expression cloning of fungal enzyme genes, *Molecular & General Genetics*. 243: 253–260.
- Higuchi et al. (1988) *NAR* 16: 7351–7367.
- Gryczan, T. J. et al. (1978) *Journal of Bacteriology*, 134, p. 318–329.
- Tomme P., R. A. Warren, R. C. Miller, Jr., D. G. Kilburn und N. R. Gilkes. 1995. Cellulose-Binding Domains: Classification and Properties. In: Saddler J. N. and M. H. Penner, eds. *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates*. Washington, DC, American Chemical Society. page 142–161.
- Yasbin, R. E., Wilson, G. A. und Young, F. E. (1975) Transformation and transfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: evidence for selective induction of prophage in competent cells. *J. Bacteriol.* 121: 296–304.

Patentansprüche

1. Bacillus-Wirt, transformiert mit einem Vektor, der eine Expressionskassette umfasst, welche als funktionsfähig verbundene Bestandteile einschließt,
 - a) eine regulatorische Region zur Initiation der Transkription und Translation;
 - b) eine DNA-Sequenz, die ein Cellulose-Bindedomäne-Polypeptid kodiert;
 - c) eine regulatorische Region zur Termination der Transkription und Translation, wobei die regulatorischen Regionen im Wirt funktionell sind, und
 - d) ein Selektionsmarker zum Selektionieren transformierter Wirtszellen,**dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid, das durch die Expressionskassette kodiert wird, keine katalytisch aktive Domäne umfasst.
2. Wirt nach Anspruch 1, wobei die DNA-Sequenz aus einem anderen Ursprung als Bacillus ssp. stammt.
3. Wirt nach Anspruch 1 oder 2, der die Fähigkeit besitzt, die Cellulose-Bindedomäne als eine einzelne Polypeptidomäne zu exprimieren.
4. Wirt nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Cellulose-Bindedomäne ein Molekulargewicht im Bereich von 4 kD bis 35 kD hat.
5. Wirt nach Anspruch 4, wobei die Cellulose-Bindedomäne ein Molekulargewicht von nicht höher als 30 kD, bevorzugt nicht höher als 28 kD, weiter bevorzugt nicht höher als 25 kD hat.
6. Wirt nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Vektor eine DNA-Sequenz umfasst, die eine einzelne Cellulose-Bindedomäne kodiert.
7. Wirt nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Vektor eine DNA-Sequenz umfasst, die eine dimere oder eine trimere Cellulose-Bindedomäne kodiert.
8. Wirt nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Vektor eine DNA-Sequenz umfasst, die eine Cellulose-Bindedomäne kodiert, welche mit mindestens einer anderen nicht katalytisch aktiven Domäne verbunden ist.
9. Wirt nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Cellulose-Bindedomäne aus einem Mikroorganismus oder aus einer Pflanze erhältlich ist, bevorzugt einem Bakterium oder einem Pilz.
10. Wirt nach Anspruch 9, wobei das Bakterium ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Gattungen Butyrivibrio, Cellulomonas, Clostridium, Microbispora, Micromonospora, Pseudomonas, Streptomyces, Thermomonospora, Bacillus, Caldocellum, Erwinia, Myxococcus, Cellvibrio, Thermoanaerobacterium, und Thermotoga.
11. Wirt nach Anspruch 9, wobei der Pilz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Gattungen Agaricus, Dictyostelium, Fusarium, Humicola, Neocallimastix, Neurospora, Limulus, Penicillium, Phanerochaete und Trichoderma.
12. Bacillus-Wirt nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 11, der neutralophil, alkalophil, mesophil oder thermophil ist.
13. Bacillus-Wirt nach Anspruch 12, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Arten Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus stearothermophilus und Bacillus amyloliquefaciens.
14. Wirt nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 13, wobei der Vektor in das Genom des nicht transformierten Wirts eingebaut wird.
15. Wirt nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 14, wobei der Vektor als ein Expressionsplasmid vorhanden ist.
16. Wirt nach einem beliebigen der Ansprüche 1 bis 15, wobei der Vektor im Genom amplifiziert wurde, oder das Expressionsplasmid ein Plasmid mehrfacher Kopienzahl ist.

17. Bacillus-Expressionsvektor, welcher eine insertierte DNA-Sequenz trägt, die ein Polypeptid kodiert, das aus einer oder mehreren Cellulose-Bindedomänen besteht, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid, das vom Expressionsvektor kodiert wird, keine katalytisch aktive Domäne umfasst.

18. Vektor nach Anspruch 17, welcher regulatorische Regionen aus einer Bacillus sp. umfasst.

19. Vektor nach Anspruch 18, wobei die regulatorischen Regionen aus Bacillus sp. für den Wirt endogen sind.

20. Verfahren zum Herstellen eines Polypeptids, bestehend aus einer oder mehreren Cellulose-Bindedomänen in einer Bacillus-Wirtszelle, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

– Wachsenlassen in einem Nährmedium unter Bedingungen, um eine Cellulose-Bindedomäne überzuproduzieren, von Bacillus-Wirtszellen, die mit einer Expressionskassette transformiert wurden, welche als funktionsfähig verbundene Bestandteile einschließt

a) eine regulatorische Region zur Initiation der Transkription und Translation,

b) eine DNA-Sequenz, die das Cellulose-Bindedomäne-Polypeptid kodiert,

c) eine regulatorische Region zur Termination der Transkription und Translation, wobei die regulatorischen Regionen im Wirt funktionell sind, und

d) ein Selektionsmarkergen zum Selektionieren transformierter Wirtszellen; und

– Gewinnen des Cellulose-Bindedomäne-Polypeptids, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid, das von der Expressionskassette kodiert wird, keine katalytisch aktive Domäne umfasst.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das hergestellte Cellulose-Bindedomäne-Polypeptid ein Molekulargewicht im Bereich von 4 kD bis 35 kD hat.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

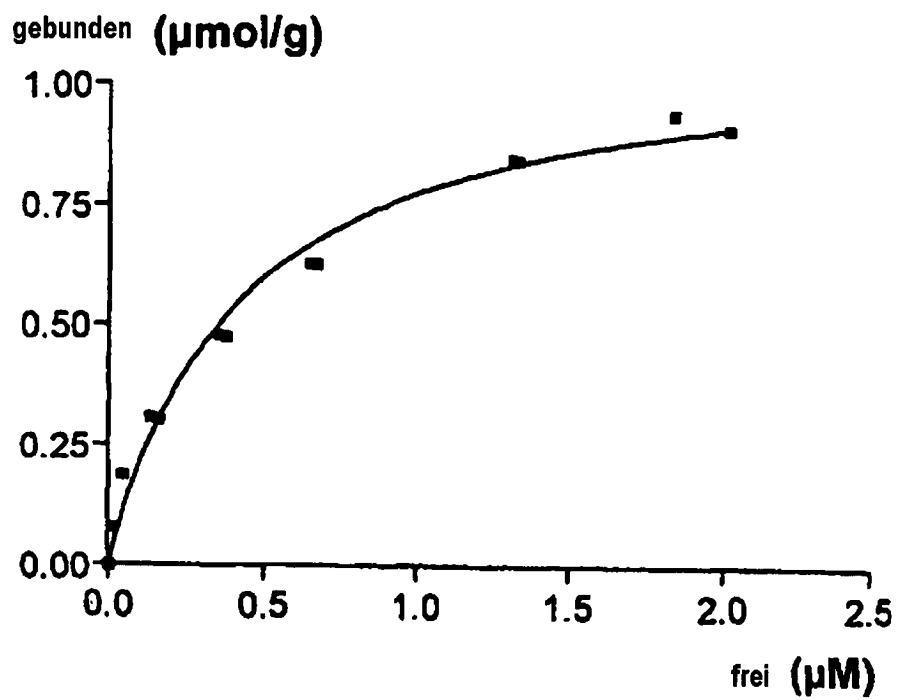


Fig. 1

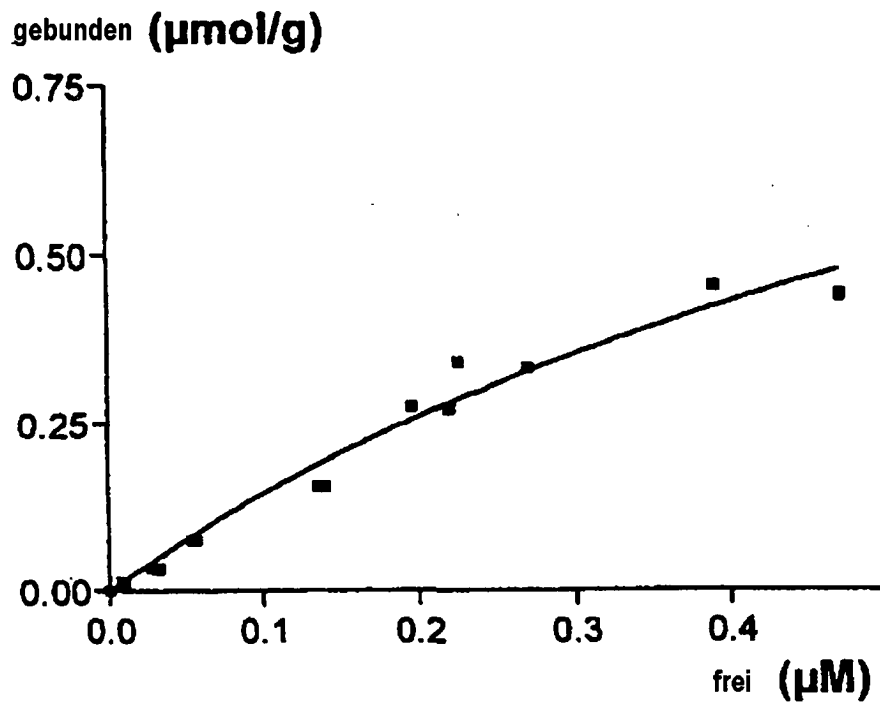


Fig. 2