(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
6. März 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/018789 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C12N 9/16, 15/82, C07K 16/12, C12Q 1/44, C12N 15/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/09289

(22) Internationales Anmeldedatum:
20. August 2002 (20.08.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 40 703.3 24. August 2001 (24.08.2001) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **DEGUSSA AG** [DE/DE]; 40474 Düsseldorf (DE).

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: **SCHWAB, Helmut** [AT/AT]; Mariagrünerstrasse 91, A-8043 Graz (AT).

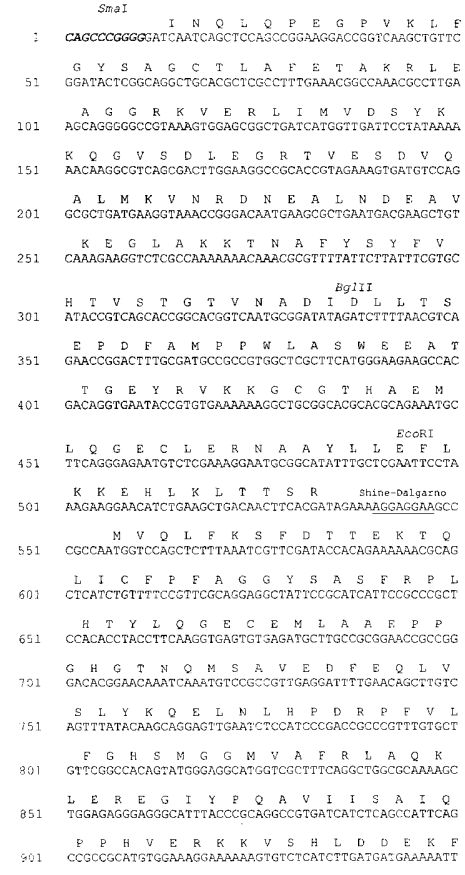
(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **GLIEDER, Anton** [AT/AT]; Wetzawinkel 20, A-8200 Gleisdorf (AT). **PRESSNIG, Michaela** [AT/AT]; Artur-Michl-Gasse 25/35, A-8042 Graz (AT). **KLEMPIER, Norbert** [AT/AT]; Untere Teichstrasse 34d, A-8010 Graz (AT). **SCHMIDT, Andrea** [AT/DE]; Wülpensand 41, 22559 Hamburg (DE).

(74) Anwalt: **ACKERMANN, Joachim**; Postfach 11 13 26, 60048 Frankfurt (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: ESTERASE EST4B1 OBTAINED FROM *BACILLUS SUBTILIS*

(54) Bezeichnung: ESTERASE EST4B1 AUS *BACILLUS SUBTILIS*



(57) Abstract: The invention relates to a thioesterase obtained from *Bacillus subtilis*, to homologous proteins of said thioesterase, to nucleic acids that code for the proteins and to antibodies against said proteins. The invention also relates to the production and use of said proteins, nucleic acids and antibodies.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine Thioesterase aus *Bacillus subtilis*, zu dieser homologe Proteine, Nukleinsäuren kodierend für diese Proteine und Antikörper gegen diese Proteine sowie die Herstellung und Verwendung dieser Proteine, Nukleinsäuren und Antikörper.

WO 03/018789 A1

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

(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*

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

Beschreibung

Esterase Est4B1 aus *Bacillus subtilis*

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Esterase aus *Bacillus subtilis*, zu dieser homologe Proteine, Nukleinsäuren kodierend für diese Proteine und Antikörper gegen diese Proteine sowie die Herstellung und Verwendung dieser Proteine, Nukleinsäuren und Antikörper.

Hydrolytische Enzyme spielen eine wichtige Rolle im Bereich der Biokatalyse, insbesondere zur Herstellung enantiomerenreiner Substanzen [1,2]. Die enzymatische Hydrolyse und Synthese von Estern erfolgt hierbei in technischen Anwendungen im wesentlichen durch drei Gruppen von Enzymen: Lipasen, Esterasen und Proteasen.

Vor allem Lipasen sind aus verschiedenen Gründen industriell erfolgreich angewendet worden [3]. Gründe hierfür sind, dass Lipasen in großen Mengen bereit gestellt werden können, dass sie sehr stabil unter den Reaktionsbedingungen sind und dass bei der Hydrolyse und Transesterifikation sehr hohe Enantioselektivität erreicht werden kann [4].

Allerdings ist die Auftrennung von Racematen in der Regel schwierig, wenn es keinen deutlichen sterischen Unterschied zwischen den beiden Stereoisomeren gibt. Außerdem sind viele Substrate bekannt, die so gut wie überhaupt nicht oder nur sehr langsam unter Verwendung von Esterasen umgesetzt werden können [5-9].

Aus den genannten Gründen besteht ein dringender Bedarf für hydrolytsiche Enzyme, insbesondere esterolytische oder lipolytische Enzyme, für den industriellen Einsatz, insbesondere zur Auftrennung von racemischen Gemischen in ihre Komponenten.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, ein neues Enzym mit hydrolytischer Aktivität, insbesondere esterolytischer und/oder lipolytischer Aktivität, zur Verfügung zu stellen, wozu angesichts der Anwendungsmöglichkeiten solcher Enzyme, insbesondere in der Biotechnologie und organischen Chemie, ein dringender Bedarf besteht, und/oder ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, womit neue hydrolytische Enzyme, vor allem esterolytische und/oder lipolytische Enzyme, erhalten werden können.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es insbesondere ein hydrolytisches Enzym, insbesondere ein esterolytisches und/oder lipolytisches Enzym zur Verfügung zu stellen, das eine gegenüber den bisher beschriebenen esterolytischen und lipolytischen Enzymen verschiedene Substratspezifität, einen unterscheidbaren Grad an Selektivität, eine unterscheidbare Reaktionsgeschwindigkeit, eine unterscheidbare Struktur und/oder einen unterscheidbaren Reaktionsmechanismus besitzt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es ferner, esterolytische und/oder lipolytische Enzyme zur Verfügung zu stellen, die dazu in der Lage sind, Ester- und/oder Thioester-Bindungen zu spalten.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die erfindungsgemäßen Polynukleotide, Polypeptide und Antikörper, insbesondere durch ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1, ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und einen gegen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 gerichteten Antikörper.

Für den Fachmann ist naheliegend, wie er ausgehend von einer Nukleinsäure gemäß SEQ ID No. 1 oder einem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 Nukleinsäuren und Polypeptide ähnlicher Struktur und gleicher oder ähnlicher Funktion erhalten kann. Insbesondere können, beispielsweise durch Evolutionsexperimente, auch Enzyme mit verbesserten Eigenschaften erhalten werden [10, 11].

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Polynukleotid ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

a) Polynukleotid mit einer Nukleinsäuresequenz von Position 556 bis 1287 gemäß SEQ ID No. 1,

b) Polynukleotide kodierend für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 2,

c) natürlicherweise vorkommende oder künstlich erzeugte Mutanten oder polymorphe Formen oder Allele eines Polynukleotids gemäß (a) oder (b), insbesondere solche, die bis zu zehn, insbesondere fünf, vor allem ein, zwei oder drei Punktmutationen in Bezug auf ein Polypeptid gemäß (a) oder (b) besitzen,

d) zu einem Polynukleotid gemäß (a), (b) oder (c) komplementäre Polynukleotide,

e) unter stringenten Bedingungen mit einem Polynukleotid gemäß (a), (b), (c) oder (d) hybridisierende Polynukleotide, wobei unter stringenten Bedingungen die dem Fachmann bekannten Bedingungen für Hybridisierungsexperimente zu verstehen sind, vorzugsweise Inkubation bei 60°C in einer Lösung enthaltend 0,1xSSC und 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS), wobei 20xSSC eine Lösung enthaltend 3 M NaCl und 0,3 M Natriumcitrat (pH 7,0) bezeichnet,

f) Polynukleotide mit einer Sequenzhomologie oder –identität von mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 60 % oder 70 %, besonders bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % oder 95 %, insbesondere mindestens 98 % in Bezug auf ein Polynukleotid gemäß (a), (b), (c), (d) oder (e),

g) Polynukleotide, bestehend aus mindestens 10 oder 15, bevorzugt mindestens 20 oder 25, besonders bevorzugt mindestens 30 oder 40, ganz besonders bevorzugt mindestens 50 oder 80, insbesondere mindestens 100 oder 120 aufeinanderfolgenden Nukleinsäuren eines Polynukleotids gemäß (a), (b), (c), (d) oder (e),

h) Polynukleotide mit ein oder mehreren Deletionen und/oder Insertionen von bis zu 50 oder 40, insbesondere bis zu 30, 20 oder 10 Nukleinsäuren gegenüber einem Polynukleotid gemäß (a), (b), (c), (d) oder (e),

i) Polynukleotide, umfassend mindestens eines der unter (a) bis (h) genannten Polynukleotide.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfassen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen, wobei es sich bei den nicht-kodierenden Sequenzen beispielsweise um natürlicherweise vorkommende Intronsequenzen oder regulatorische Sequenzen, wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen, insbesondere um solche zur Kontrolle der Expression von hydrolytischen Enzymen, insbesondere esterolytischen oder lipolytischen Enzymen, handelt.

Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren handelt es sich bevorzugt um Ribonukleinsäuren (RNAs) oder Desoxyribonukleinsäuren (DNAs), wobei die Nukleinsäuren vorzugsweise als doppelsträngige Nukleinsäuren vorliegen.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren um Nukleinsäuren, die für ein Protein mit Hydrolase-Aktivität oder Teile davon kodieren. Bei dem Protein mit Hydrolase-Aktivität handelt es sich beispielsweise um eine Halogenperoxidase, Halogenalkan-Dehalogenase, Epoxidhydrolase, Thioesterase, Lipase oder Esterase und/oder um ein Enzym, das dazu in der Lage ist, Halogenalkan-, Ester-, Thioester-, Amid-, Halid-, Epoxid- oder Peptid-Bindungen zu spalten, besonders bevorzugt Ester- oder Thioester-Bindungen. Ganz besonders bevorzugt handelt es sich hierbei um ein Enzym, das dazu in der Lage ist, regioselektiv und/oder enantioselektiv Bindungen zu spalten.

Mit Spaltung ist erfindungsgemäß vor allem hydrolytische Spaltung, also Spaltung unter Freisetzung der Carbonsäure und des entsprechenden Alkohols, Thiols, Amins oder Hydrogenhalogenids gemeint. Spaltung kann jedoch in besonderen Ausführungsformen auch unter Ausbildung einer neuen Ester-, Thioester-, Amid-, Peptid- oder Halogenidbindung erfolgen, insbesondere kann es sich hierbei beispielsweise, falls eine Ester-Bindung in eine neue Ester-Bindung umgewandelt wird, um eine Transesterifikationsreaktion handeln. Mit Spaltung sind ferner auch die von Halogenperoxidasen und Halogenalkan-Dehalogenasen katalysierten Spaltungsreaktionen von Halogenalkanen gemeint, die zur Freisetzung der entsprechenden Alkohole und Alkane führen.

In einer bevorzugten Ausführunsform handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Enzym um eine Hydrolase mit α/β-Hydrolase-Faltung und/oder um eine eigenständige Esterase oder Thioesterase als Bestandteil nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen (Schneider et al., Arch. Microbiol. (1998) 169: 404-410).

Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren handelt es sich bevorzugt um Nukleinsäuren, die für ein mikrobielles Enzym, besonders bevorzugt ein bakterielles Enzym, insbesondere für ein Enzym aus *Bacillus*, vor allem für ein Enzym aus *Bacillus subtilis*, hierbei insbesondere für die Esterase Est4B1 gemäß SEQ ID No. 2 und/oder eines der weiter unten beschriebenen erfindungsgemäßen Polypeptide kodieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, zum einen zur Herstellung oder Isolierung von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, zum anderen zur Herstellung oder Isolierung neuer, zu den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren homologen Nukleinsäuren, insbesondere solchen mit in Bezug auf die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ähnlichen strukturellen und gleichen, ähnlichen und/oder verbesserten funktionellen Eigenschaften, wobei unter funktionellen Eigenschaften insbesondere hydrolytische Aktivität, vor allem lipolytische und/oder esterolytische Aktivität, und unter verbesserten funktionellen Eigenschaften beispielsweise höhere Spezifität, höherer Umsatz und/oder höhere Regio- oder Enantioselektivität zu verstehen ist.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können so beispielsweise als Sonden zur Identifzierung und/oder Isolierung von homologen Nukleinsäuren aus einer artifiziellen, einer cDNA- oder genomischen Genbank, hierbei vorzugsweise zur Identifizierung von Nukleinsäuren, die für esterolytische Enzyme, lipolytische Enzyme und/oder für eines der erfindungsgemäßen Polypeptide oder Teilen davon kodieren, oder als Antisense-Nukleinsäuren oder als Primer in der Polymerasekettenreaktion (PCR), hierbei insbesondere zur Amplifikation von Nukleinsäuren umfassend Nukleinsäuren kodierend für Enzyme mit hydrolytischer Aktivität, insbesondere esterolytischer und/oder lipolytischer Aktivität, oder Teile davon, verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen oder zu den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren homologe Nukleinsäuren können aber auch durch Zufallsmutagenese oder zielgerichtete Mutagenese, in einer dem Fachmann bekannten Weise, erhalten werden.

Nach Einbau in einen Expressionsvektor können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren beispielsweise zur gezielten Herstellung einzelner Domänen oder Epitope eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder von Fusionsproteinen, die die erfindungsgemäßen Polypeptide umfassen, verwendet werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Verfahren, um eine Nukleinäure zu erhalten, die für ein hydrolytisches Enzym, insbesondere für ein esterolytisches und/oder lipolytisches Enzym, kodiert, folgende Schritte umfassend:

a) eine Nukleinsäurebliothek wird mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure kontaktiert,
b) eine Nukleinsäure, die mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure hybridisiert, wird identifiziert,
c) die in Schritt (b) identifizierte Nukleinsäure wird sequenziert.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ebenso ein Verfahren zur Isolierung einer für ein hydrolytisches Enzym, insbesondere für ein esterolytisches und/oder lipolytisches Enzym, kodierenden Nukleinsäure, folgende Schritte umfassend:

a) ausgehend von einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure werden Primer hergestellt,
b) die Primer gemäß (a) werden verwendet, um in der PCR Nukleinsäuren, vor allem cDNAs, unbekannter Nukleinsäuresequenz zu amplifizieren,
c) die gemäß (b) erhaltenen Nukleinsäuren werden sequenziert.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ebenfalls ein Verfahren zur Isolierung einer für ein hydrolytisches Enzym, insbesondere für ein esterolytisches und/oder lipolytisches Enzym, kodierenden Nukleinsäure, folgende Schritte umfassend:

a) Nukleinsäuren einer Bibliothek werden in geeignete Vektoren eingebaut und diese in passende Wirtsorganismen, vorzugsweise Bakterien, insbesondere *E. coli*, eingebracht, so daß die Expression der Nukleinsäuren erfolgen kann,

b) die gemäß (a) erhaltenen Wirtsorganismen werden auf einem festen Träger, vorzugsweise einer Agar-Platte, ausplattiert und inkubiert,

c) auf dem festen Träger wird ein Assay, beispielsweise eine Farbreaktion, durchgeführt, der die Umsetzung eines Hydrolase-Substrats, beispielsweise Naphthylacetat, involviert,

d) Hydrolase-positive Klone werden identifiziert, beispielsweise durch visuelle Beobachtung, durch automatisierte Imageanalyse oder mittels photometrischer Messung, und gereinigt,

e) die Nukleinsäuren aus den in Schritt (d) identifizierten Klonen werden sequenziert.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ebenfalls ein Verfahren zur Isolierung einer für ein hydrolytisches Enzym, insbesondere für ein esterolytisches und/oder lipolytisches Enzym, kodierenden Nukleinsäure, folgende Schritte umfassend:

a) eine erfindungsgemäße Nukleinsäure wird Mutagenese-Experimenten unterworfen,

b) die erhaltenen Mutanten werden in einen geeigneten Vektor eingebaut und unter Verwendung eines geeigneten Wirtsorganismus exprimiert,

c) die Expressionsprodukte werden auf hydrolytische Aktivität, insbesondere Esterase- und/oder Lipase-Aktivität hin untersucht,

d) die Nukleinsäuren, deren Expressionsprodukte in Schritt (c) hydrolytische Aktivität zeigen, werden gegebenenfalls sequenziert.

Zur Durchführung der Mutagenese-Experimente kann beispielsweise die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt werden. Die PCR-Experimente können hierbei beispielsweise, insbesondere bei Verwendung einer *Taq*-Polymerase, so durchgeführt werden, dass Reaktionsparameter wie die Mg^{2+}-Konzentration, der pH-Wert, die Reaktionstemperatur oder die Substratkonzentrationen variiert werden, oder es kann zum Einsatz von Error-prone-PCR-Techniken kommen, die

beispielsweise auf der Zugabe von Mn^{2+} oder auf der Zugabe ungleicher Nukleotidkonzentrationen beruhen.

Bei der Nukleinsäurebibliothek handelt es sich hierbei vorzugsweise um eine cDNA-, genomische oder artifizielle Bibliothek, insbesondere um eine mikrobielle, vor allem bakterielle Bibliothek, insbesondere um eine solche aus *Bacillus*, besonders bevorzugt aus *Bacillus subtilis*.

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Nukleinsäure, die nach einem der vorher genannten Verfahren erhältlich ist.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure chemisch synthetisiert wird. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können beispielsweise chemisch anhand der in SEQ ID No. 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz oder anhand der in SEQ ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz auf Grundlage des genetischen Codes z.B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Vektor, insbesondere ein Klonierungs- und/oder Expressionsvektor, umfassend eine der vorher genannten Nukleinsäuren. Der Vektor kann beispielsweise ein prokaryotischer oder eukaryotischer Expressionsvektor sein. Bei den prokaryotischen Vektoren zum Einbau der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren handelt es sich beispielsweise um die Plasmide pGEM-5Zf(+/-), pBluescript SK (-) oder pMS470 oder um ein anderes high copy number-Plasmid. Bei den erhältlichen Expressionsvekoren für die Expression in *E. coli* handelt es sich entsprechend beispielsweise um die Vektoren pTB3 oder pMS470BS1 zur Expression eines Proteins gemäß SEQ ID No. 2.

Bei den Expressionsvektoren für die Expression in *E. coli* kann es sich beispielsweise aber auch um andere kommerziell erhältliche Vektoren handeln, wie etwa den T7-Expressionsvektor pGM10 oder pGEX-4T-1 GST (Pharmacia Biotech), welche für einen N-terminalen Met-Ala-His6-Tag kodieren, der die Reinigung des

exprimierten Proteins über ein Ni^{2+}-NTA-Säule ermöglicht. Als eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* eignen sich z.B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1, für die Expression in Insektenzellen z.B. Baculovirusvektoren wie in EP-B1-0127839 oder EP-B1-0549721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z.B. SV40-Vektoren.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können in einer Ausführungsform so mit flankierenden Nukleinsäuren in einen Vektor eingebaut werden, dass bei Expression des Vektors die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodierten Polypeptide als Fusionsproteine vorliegen oder einen Tag, eine markierende Aminosäuresequenz, tragen, die beispielsweise die Reinigung oder Detektion der Polypeptide erleichtern kann. Bei dem Tag kann es sich besipielsweise um das strep-, flag-, myc- oder his-Tag handeln.

Die Expressionsvektoren enthalten bevorzugt die für die Wirtszelle geeigneten regulatorischen Sequenzen, hierbei vorzugsweise den lac- oder den tac-Promotor für die Expression in *E. coli*, den ADH-2-, GAL1- oder AOX-Promotor für die Expression in Hefen, den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen oder den frühen SV40-Promotor oder LTR-Promotoren für die Expression in Säugerzellen.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle umfassend einen erfindungsgemäßen Expressionsvektor, wobei es sich bei der Wirtszelle bevorzugt um *Bacillus*, insbesondere *Bacillus subtilis*, oder *E. coli*, insbesondere um den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) oder um den Stamm *E. coli* SURE, handelt.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren werden bevorzugt nach Einbau in einen geeigneten Vektor durch die dem Fachmann bekannten Methoden der Transfektion, Transformation oder Elektroporation in die Wirtszellen eingebracht.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der 5'-terminale Teilbereich von Nukleinsäuren, insbesonderen solchen, die für Enzyme mit hydrolytischer Aktivität kodieren, vollständig oder teilweise durch einen Teilbereich einer der

erfindungsgemäßen Nukleinsäuren ersetzt, um durch Herstellung dieser heterologen Konstrukte die Expression dieser Enzyme, insbesondere die Expression in *E. coli*, zu verbessern. Vor allem die Nukleinsäure von Position 556 bis 1287 gemäß SEQ ID No. 1, und hierbei vor allem der Bereich der ersten 150 Nukleinsäuren, zeichnet sich durch einen Codon-Gebrauch aus, der diese Nukleinsäure für die Expression in *E. coli* besonders geeignet macht, da sie einen sehr niedrigen GC-Gehalt aufweist und daher nach der Transkription weniger schwer schmelzende RNA-Strukturen vorliegen. Der 5'-terminale Teilbereich kann deshalb vor allem durch eine Nukleinsäure von Position 556 bis Position 706 gemäß SEQ ID No. 1 oder mindestens einen Teil davon, wobei der mindestens eine Teil vorzugsweise mindestens 10 Nukleinsäuren, besonders bevorzugt mindestens 20 Nukleinsäuren, vor allem mindestens 50 Nukleinsäuren umfasst, ersetzt werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist des weiteren ein Polypeptid ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

a) Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 2,
b) natürlicherweise vorkommende oder künstlich erzeugte Mutanten, polymorphe Formen oder Allele eines Polypeptids gemäß (a), vor allem solche, die bis zu fünf, insbesondere ein, zwei oder drei Punktmutationen in Bezug auf ein Polypeptid gemäß (a) aufweisen,
c) Polypeptide, die eine Sequenzhomologie oder -identität von mindestens 50 %, bevorzugt mindestens 60 % oder 70 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 80 oder 90 %, insbesondere mindestens 95 oder 98 % in Bezug auf ein Polypeptid gemäß (a) oder (b) besitzen,
d) Polypeptide, die von den zuvor genannten erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodiert werden,
e) Polypeptide bestehend aus mindestens 5 oder 6, bevorzugt mindestens 8 oder 10, besonders bevorzugt mindestens 12 oder 15, insbesondere mindestens 20, 25 oder 40 aufeinanderfolgenden Aminosäuren eines Polypeptids gemäß (a) oder (b),

f) Polypeptide mit ein oder mehreren Insertionen und/oder Deletionen von bis zu 60, 50 oder 40, insbesondere bis zu 30, 20 oder 10 Aminosäuren in Bezug auf ein Polypeptid gemäß (a), (b) oder (c),

g) Polypeptide umfassend mindestens eines der unter (a) bis (f) genannten Polypeptide.

Bevorzugt handelt es sich hierbei bei dem Polypeptid um ein hydrolytisches Enzym, besonders bevorzugt um ein esterolytisches oder lipolytisches Enzym, oder Teilen davon. Es sind hiermit Enzyme gemeint, die eine Hydrolyse-Reaktion katalysieren können, wie beispielsweise die Hydrolyse von Halogenalkan-, Ester-, Thioester-, Amid-, Epoxid-, Peptid- oder Halidbindungen, oder Teile, insbesondere Epitope oder Domänen, von solchen Polypeptiden. Insbesondere kann es sich bei dem hydrolytischen Enzym um eine Esterase, Lipase, Thioesterase, Haloalkan-Dehalogenase, Halogenperoxidase oder Epoxidhydrolase und/oder um ein Enzym, das alpha/beta-Hydrolase-Faltung aufweist und/oder um ein Enzym, das gemäß der Klassifizierung von Arpigny der Familie V zuzuordnen ist, handeln.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich hierbei um Enzyme, die eine katalytische Triade, umfassend ein Nukleophil, ein Aspartat oder Glutamat und ein Histidin, oder eine katalytische Diade in ihrem reaktiven Zentrum haben.

Bei der Spaltungsreaktion, die von einem erfindungsgemäßen Polypeptid katalysiert wird, kann es sich neben einer Hydrolyse-Reaktion etwa auch um eine hierzu analoge Reaktion, wie etwa die Ausbildung, insbesondere Neuknüpfung, einer Ester-, Thioester- oder Amidbindung handeln.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Polypeptid um ein mikrobielles, insbesondere bakterielles Enzym. Ganz besonders bevorzugt handelt es sich um ein Enzym aus *Bacillus subtilis*, insbesondere um die Esterase Est4B1 gemäß SEQ ID No. 2.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Polypeptid um ein wasserlösliches Enzym.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Polypeptid um eine Esterase oder Thioesterase, die in einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase enthalten ist oder enthalten sein kann. Es kann sich hierbei insbesondere um eine Thioesterase gemäß der Veröffentlichung von Schneider et al. (Arch. Microbiol. 1998, 169: 404-410), hier vor allem um ein *distinct thioesterase like protein*, handeln.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Polypeptids zur Spaltung von Halogenalkan-, Ester-, Thioester-, Peptid-, Amid-, Epoxid- oder Halid-Bindungen, wobei es sich bei der Spaltungsreaktion sowohl um eine Hydrolysereaktion unter Freisetzung der entsprechenden Carbonsäure bzw. des entsprechenden Alkohols oder Alkans handeln kann, als auch um die Neuknüpfung einer Ester-, Thioester-, Peptid-, Amid- oder Halid-Bindung bzw. die Neuknüpfung einer Halogenalkan-Bindung.

Erfindungsgemäß verwendbare Substrate oder herzustellende Verbindungen sind insbesondere Verbindungen der Formel R^1-C(O)-O-R^2,
wobei R^1 für einen Alkylrest mit vorzugsweise bis zu 7, vor allem bis zu 5 C-Atomen, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl oder Butyl, oder für einen Cycloalkyl- oder Heterocycloalkyl-Rest mit vorzugsweise 5 Ringatomen steht, wobei der Heterocycloalkylrest vorzugsweise genau ein Heteroatom, besonders bevorzugt Sauerstoff, trägt,
und wobei R^2 für einen Alkylrest mit vorzugsweise bis zu 6, vor allem bis zu 4 C-Atomen, insbesondere Methyl, Ethyl, Propyl oder Butyl, oder für einen Aryl-Rest mit vorzugsweise 6 bis 14 C-Atomen, insbesondere Phenyl oder Naphthyl, oder für einen Cycloalkyl- oder Heterocycloalkyl-Rest mit vorzugsweise 5 Ringatomen steht, wobei der Alkylrest auch eine Epoxid-Gruppe umfassen kann, und wobei der Heterocycloalkyl-Rest vorzugsweise genau ein Heteroatom, besonders bevorzugt Sauerstoff, trägt,
und wobei die für R^1 und R^2 genannten Reste unabhängig voneinander auch mindestens eine, besonders bevorzugt ein oder zwei, dem Fachmann bekannte Substituenten tragen können, beispielsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend

aus Halogenatomen, vor allem Cl oder Br, NO_2, NH_2, SO_3H, SO_2H, Phthalimido, OH, OR, NR_2.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Enzyme dazu in der Lage Carbonsäureester zu spalten, bei welchen die Alkoholkomponente ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus o- und p- Nitrophenol, Naphthol, Phthalimidobutanol, Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol, Glycerol, Glycidol und Hydroxy-Tetrahydrofuran und die Carbonsäurekomponente ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus 3-Hydroxybuttersäure, Tetrahydrofuran-2-carbonsäure, Buttersäure, Valeriansäure, Essigsäure, Propionsäure, Capronsäure und 2-Chlorpropionsäure, wobei die einzelnen Komponenten auch, unabhängig voneinander, Substituenten tragen oder auf sonstige Weise modifiziert sein können.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Spaltreaktion ausgeführt bei einem pH-Wert größer gleich 6,5, vorzugsweise bei einem pH-Wert zwischen 7,0 und 10,0, besonders bevorzugt bei einem pH-Wert zwischen 7,5 und 8,5, vor allem bei einem pH-Wert von etwa 8,0.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform finden die erfindungsgemäßen Polypeptide Verwendung als Bestandteil nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen, hierbei insbesondere zur Herstellung von Antibiotika, wobei die Reaktion, die durch das erfindunsgemäße Polypeptid katalysiert wird, beispielsweise der Ringschluß von zyklischen Peptidantibiotika in Form der Knüpfung einer Ester-, Thioester- oder Amidbindung sein kann.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen Enzyme verwendet, um ausgehend von racemischen Mischungen eine Isolierung oder Anreicherung eines der beiden Enantiomere zu erreichen.

Mögliche Anwendungen der erfindungsgemäßen Polypeptide sind beispielsweise die Herstellung oder selektive Anreicherung beispielsweise von Geschmacks-komponenten in der Lebensmittelindustrie, von Detergentien in der

Waschmittelindustrie, von Feinchemikalien in der chemischen Industrie oder von therapeutisch oder diagnostisch einsetzbaren Substanzen in der Pharmaindustrie.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können desweiteren beispielsweise als Epitope zur Herstellung von mono- oder polyklonalen Antikörpern verwendet werden, indem sie an einen Träger, bspw. Rinder-Serumalbumin, gekoppelt werden und anschließend ein Säuger, bevorzugt eine Maus, ein Hase oder ein Kaninchen, mit dem Epitop, bevorzugt unter Verwendung von Adjuvantien, immunisiert wird. Hierzu eignen sich bevorzugt Polypeptide mit einer Länge von 5-12, insbesondere 8, Aminosäuren. Polypeptide mit einer Länge von mehr als 60, insbesondere mehr als 75 Aminosäuren können auch ohne Träger zur Herstellung von Antikörpern verwendet werden. Die entstandenen Antikörper können anschließend gegebenenfalls isoliert werden, und ausgehend von den Antikörpern oder der für sie kodierenden Nukleinsäuren können gegebenenfalls Antikörperfragmente, beispielsweise Fab- oder scFv-Fragmente hergestellt werden.

An ein erfindungsgemäßes Polypeptid bindende Peptide können alternativ auch durch ein dem Fachmann bekanntes in vitro-Verfahren, wie beispielsweise Phage Display, Yeast Display, Bacterial Display oder etwa die sogenannte Fusagen-Technologie erhalten werden, bei der die Nukleinsäure und das von dieser kodierte Polypeptid über ein Puromycin kovalent miteinander verknüpft sind.

Die durch Immunisierung mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden erhältlichen Antiseren, Antikörper und Antikörperfragmente sowie die durch eines der genannten in vitro-Verfahren erhältlichen Peptide eignen sich beispielsweise zur Untersuchung von Genexpressionsbanken, um zu den erfindungsgemäßen Polypeptiden homologe Proteine, insbesondere solche mit hydrolytischer Aktivität, vor allem esterolytischer und/oder lipolytischer Aktivität, ausfindig zu machen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher auch Antiseren, Antikörper und Antikörperfragmente gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid sowie andere an ein erfindungsgemäßes Polypeptid bindende Peptide, insbesondere erhältich durch eines der zuvor genannten Verfahren. Antiserum, Antikörper und Antikörperfragment

sowie sonstige an ein erfindungsgemäßes Polypeptid bindende Peptide werden im folgenden der Einfachheit halber „Antikörper" genannt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids, dadurch gekennzeichnet, dass eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer geeigneten Wirtszelle, insbesondere in *Bacillus*, vor allem *Bacillus subtilis*, oder in *E. coli*, vor allem *E. coli* BL21(DE3), exprimiert wird.

Das Verfahren kann beispielsweise auf folgende Weise durchgeführt werden:

a) eine erfindungsgemäße Nukleinsäure wird in einen geeigneten Vektor eingebaut und *E. coli* wird mit dem Vektor transformiert,
b) nach der Expression des Proteins werden die Zellen geerntet und aufgeschlossen.
c) das Protein wird aus dem so erhaltenen Überstand gegebenenfalls aufgereinigt.

Kultivierung von *E. coli* erfolgt hierbei vorzugsweise zwischen 15 und 40°C, besonders bevorzugt bei etwa 37°C. Induktion der Expression erfolgt vorzugsweise in der logarithmischen Wachstumsphase. Bei Verwendung von beispielsweise einem pMS470-Vektor, der eine für ein erfindungsgemäßes Peptid kodierende Nukleinsäure umfasst, kann Induktion der Expression durch Zugabe von Laktose erfolgen, beispielsweise durch Einstellen einer finalen Konzentration zwischen 1 und 30 mM, vor allem zwischen 5 und 20 mM, insbesondere von etwa 10 mM, und/oder durch Zugabe von IPTG, beispielsweise durch Einstellen einer finalen Konzentration zwischen 0,01 und 10 mM, vor allem zwischen 1 und 5 mM. Nach der Induktion der Expression werden die Zellen vorzugsweise weitere 8-18 Stunden, insbesondere weitere 12-14 Stunden wachsen gelassen. Alternativ kann aber auch auf die Induktion der Expression verzichtet werden.

Der Aufschluß der geernteten Zellen kann durch eine dem Fachmann bekannte Methode, beispielsweise French Press, Ultraschall, Kugelmühle oder durch den Einsatz eines Sonifikators und/oder enzymatisch, erfolgen. Alternativ können die

Zellen auch chemisch, beispielsweise durch EDTA oder Polymyxin B, permeabilisiert werden.

Die gegebenenfalls durchzuführende Reinigung des Proteins erfolgt vorzugsweise chromatographisch. Die chromatographische Reinigung des Proteins kann beispielsweise die Anionen- oder Kationenaustauschchromatographie, die hydrophobe Wechselwirkungschromatographie und/oder die Gelfiltration umfassen.

In einer besonderen Ausführungsform erfolgt die Reinigung des Proteins unter Verwendung der Anionenaustauschchromatographie und einem anschließenden Gelfiltrationsschritt. Insbesondere das Protein Est4B1 gemäß SEQ ID No. 2 kann so auf vorteilhafte Weise gereinigt werden.

Bei der Anionenaustauschsäule handelt es sich hierbei vorzugsweise um eine QFF-Säule (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden), bei der Gelfiltrationssäule um eine Pharmacia Sephacryl S-100 HR in XK 26/70-Säule.
Auftrag auf und Elution von der Anionenaustauschsäule erfolgt hierbei vorzugsweise im neutralen bis leicht alkalischen Bereich, vorzugsweise zwischen pH 6.5 und pH 8.5, ganz besonders bevorzugt bei etwa pH 7.5. Vorzugsweise wird hierzu ein 10 mM Tris-HCl-Puffer verwendet. Elution des Proteins wird vorzugsweise dadurch erreicht, dass die Ionenstärke des Elutionspuffers langsam erhöht wird. Dies kann beispielsweise durch Zugabe von NaCl in einem Stufengradienten erreicht werden. Elution des Proteins erfolgt hierbei vorzugsweise bei einer NaCl-Konzentration zwischen 150 mM und 300 mM oder bei Verwendung eines anderen Salzes unter Vorgabe derselben Ionenstärke.
Nach der Elution des Proteins werden die aktiven Fraktionen vorzugsweise vereint und eingeengt. Der Auftrag auf die Gelfiltrationssäule erfolgt vorzugsweise unter denselben Bedingungen wie der Auftrag auf die Anionenaustauschsäule. Die Elution des Proteins erfolgt beispielsweise mit einer Flussrate zwischen 2 und 6 ml min^{-1}, insbesondere mit einer Flussrate von etwa 4 ml min^{-1}.

Vor allem die kurzkettigen erfindungsgemäßen Polypeptide können auch mit Hilfe der klassischen Peptidsynthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung von Kristallen, enthaltend mindestens eines der erfindungsgemäßen Polypeptide, sowie die durch dieses Verfahren erhältlichen Kristalle. Die Kristallisation erfolgt hierbei vorzugsweise bei einem pH-Wert zwischen 6,0 und 9,0, besonders bevorzugt zwischen 7,0 und 8,0, vor allem bei einem pH-Wert von etwa 7,5 und/oder unter Verwendung von PEG, vor allem PEG 4000, als Präzipitationsmittel, wobei der Mengenanteil von PEG vorzugsweise zwischen 10 und 50 %, besonders bevorzugt zwischen 20 und 36 %, vor allem etwa 28 % beträgt, und/oder bei Anwesenheit von Natriumacetat, wobei die Konzentration des Natriumacetats vorzugsweise zwischen 0,1 und 0,3 M, vor allem bei etwa 0,2 M liegt.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Testsystem zur Identifizierung von Substraten oder funktionellen Interaktoren enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes Polypeptid und/oder einen erfindungsgemäßen Antikörper und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe.

Bacillus subtilis ist dafür bekannt, dass es Pflanzenpathogene abwehren kann und Symptome von Pflanzenschädlingen, wie z.B. Erwinia, lindert. Dieser positive Effekt ist nicht zuletzt auf Enzyme mit hydrolytischer Aktivität, insbesondere Esterasen und Thioesterasen zurückzuführen. Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb die Verwendung von mindestens einem erfindungsgemäßen Polynukleotid und/oder von mindestens einem erfindungsgemäßen Polypeptid und/oder von mindestens einem erfindungsgemäßen Antikörper zur Abwehr von Pflanzenpathogenen und/oder Pflanzenschädlingen sowie eine Zusammensetzung zur Behandlung von Pflanzenpathogenen und/oder Pflanzenschädlingen, umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes Polynukleotid und/oder mindestens ein erfindungsgemäßes Polypeptid und/oder mindestens einen erfindungsgemäßen Antikörper.

Darüberhinaus kann ein erfindungsgemäßes Polynukleotid auch in einer dem Fachmann bekannten Weise in eine Pflanze eingebracht werden, um in dieser ein erfindungsgemäßes Polypeptid zu produzieren und dieser so Resistenz gegenüber

Pflanzenpathogenen zu verleihen. Das erfindungsgemäße Polynukleotid kann hierbei insbesondere in eine einzelne pflanzliche Zelle eingebracht werden und aus dieser durch Vermehrung und Differenzierung eine Pflanze erhalten werden, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid und/oder Polypeptid umfasst.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb auch ein Verfahren zum Einbringen eines erfindungsgemäßen Polynukleotids in eine pflanzliche Zelle sowie eine Pflanze und/oder pflanzliche Zelle, umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes Polynukleotid und/oder mindestens ein erfindungsgemäßes Polypeptid.

Erfindungsgemäß kann auch ein Nukleotid oder mehrere Nukleotide der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder eine oder mehrere Aminosäuren der erfindungsgemäßen Polypeptide oder der erfindungsgemäßen Antikörper modifiziert sein. Bei der Modifikation kann es sich etwa handeln um eine radioaktive, fluorogene oder chromogene Gruppe oder um eine posttranslationale Modifikation.

Im folgenden werden bestimmte Ausführungsformen der Erfindung exemplarisch anhand von Abbildungen und Ausführungsbeispielen erläutert.

Abbildungen

In Fig.1 ist eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz genomischer DNA aus *Bacillus subtilis* dargestellt. Dieses genomische DNA-Fragment von *B. subtilis* umfaßt einen vollständigen open reading frame (ORF) (*est4B1*) sowie zwei partielle ORFs (*orf1* und *orf3*). Die putative Shine-Dalgarno-Sequenz des Gens *est4B1* ist unterstrichen. Sequenzen des Klonierungsvektors pBluescript SK(-) sind durch fette Kursivschrift kenntlich gemacht.

In Fig. 2 ist das klonierte DNA-Fragment aus Figur 1 nochmals schematisch dargestellt. Neben dem ORF für Est4B1 (BS1) und den beiden partiellen ORFs (ORF1, ORF3) wurden einige Restriktionsschnittstellen kenntlich gemacht. Die

Aminosäuresequenz zeigt große Ähnlichkeit zu putativen Proteinen aus *B. subtilis* A13.

In Fig. 3 sind Ergebnisse von Studien zur Expression von Est4B1 mittels *E. coli* BL21 (pMS470BS1) bei 37°C dargestellt. Die Expression wurde induziert durch Zugabe von Laktose unter Einstellen einer finalen Konzentration von 10 mM zu verschiedenen Zeitpunkten: (A) Induktion erfolgte unmittelbar nach dem Animpfen, (B) 4 Stunden, (C) 6 Stunden, (D) 8 Stunden, (E) 10 Stunden, (F) 12 Stunden nach dem Animpfen. (G) *E. coli* BL21 (pBluescript SK-) wurde als Negativkontrolle verwendet. Aufgetragen wurden Protein-Rohlysate.

In Fig. 4 sind die erfindungsgemäß erhaltenen Kristalle von Est4B1 dargestellt.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Isolierung und Charakterisierung des Bakterienstamms Est4

Es wurden große Halos auf kontaminierten Tributyrin-Emulsions-Agarplatten beobachtet. Bei der Herstellung der Agarplatten wurde ein unzureichend gereinigtes Ultrathurax-Homogenisiergerät verwendet, das zuvor für die Homogenisierung von Pflanzenmaterial verwendet worden war. Eine Bakterienkultur, die einen großen Halo bildete wurde isoliert und mehrmals neu ausplattiert, um sicherzustellen, dass eine einzelne Kolonie vorliegt. Die Halo-Bildung konnte sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 30, 37 und 50°C beobachtet werden. Der so erhaltene Stamm wurde Est4 genannt und zur Charakterisierung an die Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig (Deutschland) geschickt. Dort konnten 4 verschieden Varianten dieses Stamms identifiziert werden, die Est4A, Est4B, Est4C und Est4D genannt wurden. Est4A und Est4B wurden im folgenden weiter charakterisiert. Bei beiden Stämmen handelt es sich um *B. subtilis*-Stämme und der einzige Unterschied zwischen den beiden ist, dass Est4A Lecithinase produziert, nicht jedoch Est4B. Nach Erhalt der getrennten Stämme von der DSMZ wurde der *B. subtilis*-Stamm Est4A auf LB-Agarplatten kultiviert, wobei erneut mehrere morphologische Varianten beobachtet werden konnten. Es scheint

so, dass diese Varianten verschiedene morphologische Formen ein- und desselben Stammes darstellen, und dass es sich hierbei nicht um kontaminierende Stämme handelt. Unter dem Lichtmikroskop zeigten die verschiedenen Varianten die gleiche Gestalt, aber unterschiedliche Mobilität. Es ist auch gezeigt worden, dass Est4A, B, C und D unterschiedliche Esterase- und Lipase-Profile aufweisen. Esterase-Aktivität konnte in allen 4 Varianten aufgefunden werden, aber die Varianten Est4A und C zeigten zusätzlich Lipaseaktivitäten mit unterschiedlicher Stereopräferenz. Est4B wurde im folgenden zur Klonierung der Esterase verwendet.

Beispiel 2: Bakterienstämme und Wachstumsmedien

Die *Bacillus subtilis*-Stämme Est4A, Est4B, Est4C und Est4D wurden von Tributyrin-Emulsions-Agarplatten isoliert und anschließend auf Luria Broth (LB)-Agarplatten kultiviert. *E. coli* SURE und der Klonierungsvektor pBluescript SK(-) von Stratagene (La Jolla, CA, USA) wurden für die Standard-Klonierungsexperimente verwendet. *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene) wurde als Wirt für die Enzym-Produktion verwendet. Der Vektor pMS470Δ8, der für die heterologe Enzymexpression verwendet wurde, war ein Geschenk von E. Lanka (18).

E. coli-Zellen wurden normalerweise bei 37 °C in LB-Medium, enthaltend 100 mg/l Ampicillin, wachsen gelassen. Zur Herstellung der Tributyrin-Emulsions-Agarplatten, wurden 5-7 g/l Tributyrin zum geschmolzenen Agar hinzugegeben und anschließend erfolgte Emulsifizierung durch Sonifikation mit einem Ultrathurax-Homogenisiergerät, bevor der Agar in die Schalen gegossen wurde.

Beispiel 3: Herstellung und Screening einer genomischen Bibliothek von *B. subtilis* Est4B

Genomische DNA von *B. subtilis* Est4B wurde unter Verwendung des Qiagen (Qiagen, Hilden, Deutschland) Genomic Kit (Tip 500) aus Zellen isoliert, die über Nacht bei 37 °C in LB-Medium gewachsen waren. 10 µg der genomischen DNA wurde partiell mit *Sau*3AI (Roche, Mannheim, Deutschland) verdaut. Die Fragmente wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese nach der Größe aufgetrennt und Fragmente mit einer Größe zwischen 4-8 kb wurden aus dem Gel herausgeschnitten und unter Verwendung des Qiaex DNA Elution Kit (Qiagen) gereinigt. Die genomischen DNA-Fragmente wurden in die *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle des

Vektors pBluescript SK(-) ligiert. Die Transformation von *E. coli* SURE-Zellen wurde direkt mit diesem Ligationsansatz durchgeführt, ohne vorherige Amplifikation der Bibliothek.

Aktive Klone wurden mit einem Agarplatten-Filterpapier-Esteraseassay [13, 14] identifiziert. 2-Chlorpropionsäure-2-naphthylester wurde als Substrat zum Screenen der Bibliothek verwendet. Ein Klon, der *E. coli* (pTB3) genannt wurde, wurde isoliert und das Insert des Plasmids pTB3 wurde sequenziert. Die Sequenz ist in Fig. 1 dargestellt. Sie zeigt, dass das Insert an einem Ende auf unübliche Weise mit dem Bluescript-Vektor SK(-) ligiert ist.

Beispiel 4: Sequenzanalyse des ORF (open reading frames) von pTB3

Plasmid-DNA wurde unter Verwendung eines Plasmid-DNA-Isolationskits (Qiagen) gereinigt und das Insert wurde mittels eines automatisierten Sequenziergeräts (ABI 373A Automated Sequencer) und unter Verwendung des Dye Deoxy Terminator Sequencing Kits von Perkin Elmer Biosystems (California, USA) sequenziert. DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem GCG Program Package (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA) analysiert.

Die Sequenzanalyse ergab, dass durch das *Bacillus subtilis* DNA-Fragment, das im Vektor pTB3 enthalten ist, ein Protein vollständig sowie zwei Proteine partiell kodiert werden (Fig. 2). Der partiell enthaltene ORF1, der für den C-Terminus eines Proteins kodiert, zeigt große Aminosäure-Sequenz-Homologie zu integrierten Thioesterasen von Surfactin-Synthetase-Genclustern. 98 % Aminosäuresequenzhomologie wurde gefunden zu dem putativen Surfactin-Synthetase-Protein SrfC aus *Bacillus subtilis* A13. Die Gensequenz dieses stark homologen Proteins besitzt in der NCBI-Datenbank die Accession No. AF233756.

Der ORF2 kodierte für ein Protein mit 243 Aminosäuren und wurde Est4B1 genannt. Dieses Protein ist homolog zu einer putativen eigenständigen und nicht C-terminal fusionierten Thioesterase aus *Bacillus subtilis* A13 (Accession No. AAF87217) und zu der Untereinheit 4 einer Surfactin-Synthetase aus *Bacillus subtilis* ATCC 21332, die auch als Kälteschockprotein CSI16 (Accession No. Q08788) bekannt ist. Die Funktion der Surfactin-Synthetase blieb bislang ungeklärt. Jedoch gibt es Vermutungen, dass es in die Termination der Peptidsynthese oder in die Freisetzung falsch geladener Moleküle involviert ist [28].

Interessanterweise zeigte die vorhergesagte Struktur von Est4B1 eine stärkere Homologie zu anderen Enzymen der Familie der alpha/beta-gefalteten Hydrolasen als etwa zu den Esterasen und Lipasen dieser Familie. Die stärkste Homologie wurde gefunden zu den folgenden Enzymen: Haloperoxidase L (*Streptomyces lividans*), Chlorperoxidase F (*Pseudomonas fluorescens*), Bromperoxidase A2 (*Streptomyces aureofaciens*), Prolin-Iminopeptidase (*Seratia marescens*), Haloalkan-Dehalogenase (*Xanthobacter autotrophicus*) und Hydroxynitril-Lyase (*Hevea brasiliensis*). Aus diesem Grunde ist davon auszugehen, dass ebenfalls halogenierte Esterverbindungen und Ester mit Stickstoff-haltigen Gruppen von Est4B1 umgesetzt werden können.

Beispiel 5: Herstellung des Expressionsklons pMS470BS1

Es wurden PCR-Primer mit Restriktionsschnittstellen für *Nde*I und *Sph*I hergestellt (B3ADstart: 5'GAACACACATATGGTCCAGCTC3', B3ADend: 5'AGCGCATGCTGTCTGTCATATC3'). Diese Primer wurden hergestellt, um mittels PCR geeignete Restriktionsschnittstellen am 5'- und 3'-Ende des für das Protein Est4B1 kodierenden Gens einführen zu können. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt, unter Verwendung von 10 ng Template-DNA (pTB3), 5 µl dNTPs (1 mM jeweils), 200 ng von jedem Primer, 5 µl PCR-Puffer (10 x Dynazyme) und 2 Einheiten (Units) Dynazyme DNA-Polymerase (Finnzyme, Espoo, Finnland). Es wurden 6 Zyklen mit 94 °C (1 min), 38°C (2 min) und 72 °C (2 min) durchgeführt, gefolgt von 23 Zyklen mit 94 °C (1 min), 65 °C (2 min) und 72 °C (2 min). Das PCR-Produkt wurde gereinigt unter Verwendung des Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) und anschließend mit *Nde*I und *Sph*I verdaut. Anschließend erfolgte Ligation in das Expressionsplasmid pMS470 unter Ersatz des Inserts des Vektors pMS470Δ8. Dieser Vektor enthält den stark regulierten *tac*-Promoter und ermöglicht den Einbau des Gens an ein ATG-Startkodon in 3'-Richtung von einer hoch effizienten Shine Dalgarno Sequenz, die vom T7-Gen 10 herstammt. Das so erhaltene Konstrukt wurde pMS470BS1 genannt.

E. coli wurde mit dem so erhaltenen Plasmid transformiert. Klone, die Esterase-Aktivität zeigten, wurden durch den zuvor beschriebenen Agarplatten-Filterpapier-Assay identifiziert. Die Plasmid-DNA eines positiven Klons wurde nach der Isolation

sequenziert, um zu bestimmen, ob die Sequenz mit der nativen Sequenz übereinstimmt.

Beispiel 6: Herstellung der Esterase Est4B1

Eine Vorkultur von *E. coli* BL21 (pMS470BS1) wurde hergestellt durch Kultivierung der Zellen in LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin über Nacht bei 37 °C unter Schütteln. Diese Über-Nacht-Kultur wurde verwendet, um 100 ml LB-Medium in einem 300 ml Erlenmeyer-Kolben anzuimpfen. Unter Schütteln wurden die Zellen bei 37 °C wachsen gelassen, bis die Kultur sich mitten in der logarithmischen Wachstumsphase befand. Schließlich wurde die Hauptkultur (300 ml in 1 l-Kolben) mit 10 ml der zweiten Vorkultur angeimpft. Zur Induktion der Expression wurde unmittelbar nach der Animpfung eine 1M Laktose-Stammlösung hinzugegeben, um eine finale Konzentration von 10 mM einzustellen. Die Zellen wurden für weitere 12-14 Stunden bei 37 °C kultiviert und anschließend durch Zentrifugation geerntet. Das Zell-Sediment wurde in 20 ml Tris-HCl-Puffer (0,1 M, pH 7.5) resuspendiert und nach Zugabe von 1 Einheit (Unit) Benzonase pro Kolben eingefroren. Die Zellsuspension wurde aufgetaut und durch Sonifikation lysiert (Branson Sonifier 250, gepulste Sonifikation für 6 min). Die Zellreste wurden durch Zentrifugation mit 100.000 g für 1 Stunde abgetrennt. Der Überstand mit dem löslichen Est4B1-Protein wurde aliquotiert und bei –18 °C eingefroren.

Auf diese Weise konnte die Esterase Est4B1 in sehr großer Ausbeute erhalten werden. Die Expression der Esterase war sehr stark im Vergleich zur Expression anderer Esterasen, die unter denselben Bedingungen produziert worden waren. Dies deutete darauf hin, dass der Codon-Gebrauch in diesem *Bacillus subtilis*-Gen sehr gut für die Expression in *E. coli* geeignet ist. Insbesondere die ersten 150 Codons weisen im Vergleich zu den entsprechenden Codons aus Esterasen aus anderen Organismen einen niedrigeren GC-Gehalt auf, so dass weniger schwer-schmelzende RNA-Strukturen vorliegen und damit die Expression in *E. coli* erleichtert wird.

Beispiel 7: Reinigung der Esterase Est4B1

Das Protein wurde durch ein Zweischritt-Verfahren gereinigt. Der Überstand wurde hierzu auf eine 15 ml QFF-Säule gegeben (Amersham Pharmacia, Uppsala,

Schweden) und unter Vorgabe eines Stufengradienten, beginnend mit Puffer A (10 mM Tris-HCl, pH 7.5) unter Erhöhung des Anteils an Puffer B (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2M NaCl), eluiert. Der Hauptteil von Est4B1 wurde eluiert, indem 15 ml Puffer mit einem Anteil von 8.5 % Puffer B über die Säule gegeben wurde und anschließend weitere 30 ml Puffer über die Säule gegeben wurde, wobei ein flacher Gradient angelegt wurde, so dass sich der Anteil an Puffer B von 8.5 % auf 13 % erhöhte. Die Fraktionen mit dem Enzym wurden anschließend vereint und auf 5-8 ml durch Ultrafiltration mit den Zentrifugationssäulchen Centricon YM-10 (Millipore, Bedford, USA) eingeengt. Zur weiteren Reinigung wurde eine Gelfiltration mit einer Pharmacia Sephacryl S-100 HR in XK 26/70-Säule bei einer Flussrate von 4 ml min^{-1} durchgeführt. Est4B1 wurde auf diese Weise in sehr sauberer Form erhalten.
Mittels MALDI wurde für das Molekulargewicht des Enzyms ein Wert von 27445 Da bestimmt. Jedoch betrug das berechnete mittlere Molekulargewicht 27760 Da. Dieser kleine Unterschied ist möglicherweise zurückzuführen auf eine posttranslationale N-terminale Modifikation der ersten Aminosäuren oder aber auf Ungenauigkeiten bei der Massenspektrometrie.

Beispiel 8: Kristallisation des Proteins Est4B1

Für die Kristallisationsexperimente wurde eine Enzymlösung mit einer Proteinkonzentration von 6,5 mg/ml eingesetzt. Es wurde die Dampfdruck-Diffusions-Methode des hängenden Tropfens (hangig drop) angewendet. Hierzu wurden in einer dem Fachmann bekannten Weise silikonisierte Glasplättchen und Linbro-Kulturplatten mit 24 Vertiefungen verwendet. Die Glasplättchen mit den Tropfen wurden auf die Vertiefungen aufgebracht und anschließend erfolgte Abdichtung unter Verwendung von Hochvakuum-Fett. Zur Herstellung der Tropfen wurden 5 µl Proteinlösung und 5 µl der Fällungsmittel enthaltenden Lösung, die dem in die Vertiefung aufgetragenen 750 µl-Reservoir entnommen wurde, miteinander vermischt. Die Experimente wurden vorzugsweise bei 20 °C ausgeführt. Als Standard wurde der Coarse Matrix Crystallization Screen von Hampton verwendet. Platten-förmige Kristalle wurden unter folgenden Bedingungen beobachtet: 28% PEG 4000, 0.2 M NaAc, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5. Die erhaltenen Kristalle stellen einen wichtigen Schritt zur Lösung der 3D-Struktur dieser Klasse von hydrolytischen Enzymen dar.

Beispiel 9: Enzym-Assays zur Bestimmung der hydrolytischen Aktiviät von Est4B1

Agarplatten-Filterpapier-Assay

Positive Signale mit dem Agarplatten-Filterpapier-Assay hinsichtlich der Hydrolyse von 2-Chlorpropionsäure-2-naphthylester zeigten, dass Est4B1 Esterase-Aktivität besitzt. Rohlysate von *E. coli* BL21(DE3) oder gereinigtes Enzym wurden für die weitere Analyse der Esterase-Aktivität dieses Enzyms verwendet.

Photometrischer Assay

Esterase-Aktivität wurde photometrisch in Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 7.0) mittels *ortho*- und *para*-Nitrophenyl-butyrat (4 mM in DMSO) als Substrate gemessen. Die Menge an Nitrophenol, die bei der enzymatischen Reaktion freigesetzt wurde, wurde photometrisch bei 405 nm und Raumtemperatur bestimmt. Eine Aktivitätseinheit ist definiert als die Menge an Enzym, die 1 µmol Alkohol min^{-1} unter den Assay-Bedingungen freisetzt. Unter den vorgegebenen Bedingungen betragen die Extinktionskoeffizienten von *ortho*- und *para*-Nitrophenol 2,42 bzw. 9,6 ml µmol/ l cm. Bei dem photometrischen Assay mit 4-Nitrophenylbutyrat konnte eine spezifische Aktivität von 0,3 U/mg festgestellt werden, während mit 2-Nitrophenylbutyrat als Substrat ein Wert geringer als 0,01 U/mg ermittelt wurde. Die Ergebnisse zum photometrischen und alkalimetrischem Assay sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Enzym-Präparationen, die durch Anionenaustauschchromatographie gereinigt worden waren, wurden in der alkalimetrischen Titration eingesetzt.

Alkalimetrische Titration

Esterase-Aktivität von Est4B1 in Hinsicht auf Tributyrin, 3-Hydroxybuttersäure-ethylester und 2-Chlorpropionsäure-methylester wurde durch alkalimetrische Titration bestimmt unter Verwendung des Autotitrators Mettler DL 21 von Mettler Toledo (Schweiz). Hierzu wurden 50 ml 20 mM NaH_2PO_4-Lösung mit 100 µl Substrat und 0,75 ml BS1-Lysat (entsprechend 56 U Esterase, bestimmt unter Verwendung von *para*-Nitrophenylbutyrat) bei pH 7.5 und 30 °C verwendet.

Es konnte hierbei eine Aktivität von Est4B1 hinsichtlich 2-Chlorpropionsäure-methylesters von 0,5 U/mg Protein ermittelt werden. Als pH-Optimum für die

Hydrolyse wurde ein Wert von 8 ermittelt. Die Aktivität war stark reduziert bei einem pH-Wert kleiner 6,5. Das Protein präzipitierte bereits im leicht sauren Bereich. Die hydrolytische Aktivität hinsichtlich 3-Hydroxybuttersäure-ethylester war geringer als 0,01 U/mg. Keine Aktivität konnte festgestellt werden mit Tributyrin als Substrat.

Tab. 1: Substrate, die auf Hydrolyse durch Est4B1 photometrisch oder alkalimetrisch untersucht wurden

Substrat	photometrisch	alkalimetrisch
3-Hydroxybutter-säure-ethylester	n.d	+/-
2-Chlorpropionsäure-methylester	n.d	+
Tributyrin	n.d	-
4-Nitrophenylbutyrat	+	n.d
2-Nitrophenylbutyrat	+/-	n.d
Fettsäure-CoA-ester	-	-

+ = starke Aktivität, +/- = schwache Aktivität, - = keine Aktivität, n.d = nicht ermittelt

Dünnschichtchromatographie (TLC)

Die dünnschichtchromatographischen (TLC) Experimente wurden durchgeführt, indem 100 µl Bakterien-Rohlysat der Est4B1 überexprimierenden Kulturen in 0,5 ml Puffer (0,1 NaH_2PO_4, pH 7.3) suspendiert wurden. Als Negativ-Kontrolle wurde jeweils Rohlysat von Zellen ohne Vektor verwendet. Nach der Zugabe des Substrats (20 µl) wurde die Mischung auf einem Drehschüttler (150 rpm) bei Raumtemperatur (25° C) geschüttelt. Nach 2 und 4 Stunden sowie nach 1 Tag (20-24 Stunden) wurden Proben entnommen und direkt mittels TLC analysiert, wobei Merck Silicagel 60 F_{254} verwendet wurde. Soweit technisch realisierbar wurden die in Tab. 4 angegebenen Substrate in der TLC eingesetzt.

Die Zusammensetzung des Elutionsmittels (Cyclohexan/Ethylacetat) und die Visualisierungsmethode (Besprühen mit Vanillin/H_2SO_4 conc. oder Cerammonium-molybdat sowie Wärmebehandlung und/oder UV-Detektion) wurden in Abhängigkeit vom Substrat ausgewählt.

Beispielsweise wurde für die Substrate Octanyl-2-acetat und 2-Chlor-propionsäure-2-naphthylester zur Elution eine Mischung aus Benzin/Ethylacetat (3:1) verwendet und die Produkte wurden sichtbar gemacht, indem sie mit Vanillin/H_2SO_4 conc. besprüht wurden. Für die Substrate Mandelsäure-ethylester und 3-Hydroxybutansäure-ethylester wurde zur Elution eine Mischung aus Benzin/Ethylacetat (1:1) eingesetzt. Die entstandenen Verbindungen wurden im Falle des Mandelsäure-ethylesters sichtbar gemacht durch UV-Detektion, im Falle des Hydroxybutansäure-ethylesters durch Besprühen mit Cerammonium-molybdat.

Die genannten Substrate wurden von Sigma (St. Louis, MO, USA) bezogen, mit Ausnahme des 2-Chlor-propionsäure-2-naphthylesters und des 2-Octanylacetats, die als Geschenk von Michael Schmidt vom Institut für organische Chemie (TU Graz) erhalten wurden.

Die hydrolytische Aktivität der Esterase hinsichtlich der Substrate konnte ermittelt werden durch die Konversionsrate des Acetats in den entsprechenden Alkohol bzw. des Esters in die entsprechende Säure. Die Konversionsrate wurde in der TLC ermittelt auf Grundlage der Farbintensitäten des Ausgangsmaterials und der Produkte. Tab. 2 gibt einen Überblick über die Ergebnisse zur TLC.

Tab. 2: Ergebnisse der TLC-Analyse (+ schwache Aktivität (<20% Konversion); ++ hohe Aktivität (~20-50% Konversion); - keine nachweisbare Aktivität; zur Numerierung der Substrate s. Tab. 4)

	Est4B
1	-
3	+
4	++
5	-
6	++
7	-
8	-
9	++
10	-
11	++
13	++
15	-
16	-

Es wurde so etwa beobachtet, dass nach 20 Stunden der Großteil des 2-Chlorpropionsäure-2-naphthylesters durch Est4B1 hydrolysiert worden ist, während eine Hydrolyse von Mandelsäureethylester (**15**, **16**) oder Octanoyl-2-acetat nicht beobachtet werden konnte. Insgesamt konnten 5 Substrate ausfindig gemacht werden, die hinsichtlich industrieller Anwendungen in ausreichender Weise durch die Esterase Est4B1 konvertiert werden (gekennzeichnet mit ++ in Tab. 2) und die anschließend auf Selektivität des Umsatzes hin untersucht werden konnten. Alle Substrate, bei denen bis zu etwa 50% Umsatz vorlag, wurden in weiteren Untersuchungen eingesetzt, um die Enantioselektivität des Umsatzes zu untersuchen.

Die Aktivität der Esterase hinsichtlich der Verbindungen **2** und **12** mußte mittels Gaschromatograpie untersucht werden, da Verbindung **12** nicht durch TLC visualisiert werden kann und Verbindung **2** sehr flüchtig ist.
Desweiteren ist die bei der Umsetzung von Verbindung **14** entstehende Säure (R,S)-3-Hydroxy-2-methyl-propionsäure kein stabiles Produkt, so dass auch die Untersuchung dieser Reaktion mittels TLC nicht möglich war.

Chirale Gaschromatographie (GC) und high pressure liquid chromatography (HPLC)
Die Aktivitäts-Analyse wurde in wässrigem Natriumphosphat-Puffer (0,1 M; pH 7.3) durchgeführt. Normalerweise wurden 5 ml Puffer mit 250 µl Enzym gemischt (Bakterien-Rohlysat) und 100 µl Substrat hinzugegeben. Die so erhaltene Mischung wurde auf einem Rührschüttler mit 150 rpm bei Raumtemperatur (ca. 25°C) geschüttelt. Nach 2, 5 und ungefähr 20 Stunden wurden Proben genommen und die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml CH_2Cl_2 gestoppt. Nach der Extraktion, Zentrifugation und Abtrennung der wässrigen Phase wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Ein 1µl-Aliquot wurde für die GC verwendet, nachdem es mittels einer Filtermembran (Nylon, ∅3 mm, 0.2µm, Roth) gefiltert worden war.
Die enantiomere Reinheit des Produkte wurde auf einer 2,3,6-Tri-O-methyl-β-cyclodextrin-Säule (Chrompack Chirasil-Dex-CB, 25 m x 0.32 mm, 0.25µm film, H_2) bestimmt.

2-Chlorpropionsäure-2-naphthylester **11** und 1-Acetoxy-2-phthalimido-butan **6** wurden so der HPLC-Analyse unterworfen. Im ersten Fall konnte jedoch nur der Ester durch UV beobachtet werden, während in Bezug auf die Verbindung **6** nur der korrespondierende Alkohol auf einer Chiralcel OD-H Säule (Daicel 25 cm x 0.46 cm) ermittelt werden konnte.

Folgende Reaktionsbedingungen wurden vorgegeben: Analyse-Parameter für den **6**-Alkohol: Heptan : Isopropanol = 90 : 10; Flußrate 0,5 ml min^{-1}, 10°C, UV-Detektion bei 230 nm. Analyse-Parameter für Verbindung **11**: Heptan : Isopropanol = 95 : 5, Flußrate 0,5 ml min^{-1}, 10°C, UV-Detektion bei 254nm.

Tab. 3: Ergebnisse der chiralen Gaschromatographie und der HPLC für Substrat **6** (Werte nach 2, 5 und 24 Stunden)

	Est-4B		
	Ester ee[%]	*Alkohol/Säure ee[%]*	*Konversion [%][a]*
6	2h[b]	31	24
	5h[b]	50	40
	1d[b]	56	63

[a] die Konversion wurde berechnet in Bezug auf die Menge an gebildetem Alkohol bzw. in Bezug auf die Menge an gebildeter Säure

[b] der Ester konnte mittels HPLC nicht aufgelöst werden

Obwohl die Bibliothek aus *B.subtilis* Est4B nach Klonen untersucht wurde, die (*R,S*)-2-Chlorpropionsäure-naphtylester **11** hydrolysieren und die Ergebnisse der TLC-Analyse in Bezug auf Verbindung **11** Hoffnung machten (Tab. 1) konnte keine enantioselektive Hydrolyse dieser Verbindung durch die Esterase Est4B1 beobachtet werden.

In Bezug auf das Substrat **6** (±)-N-Phthaloyl-2-amino-1-butyl-acetat zeigte die Esterase Est4B1 (56% e. e., 63% Konversion) Selektivität in Bezug auf den Alkohol (Tab. 2). Die enantiomere Reinheit des korrespondierenden Acetats konnte bislang nicht bestimmt werden. Hierbei zeigte die Esterase Est4B1 interessanterweise gegenüber drei anderen getesteten Esterasen eine entgegengesetzte Enantiopräferenz.

Est4B1 zeigte in der GC/HPLC fast keine Aktivität und Selektivität in Hinblick auf das Acetat von *(R,S)*-3-butin-2-ol (**2**), Tetrahydrofuran-3-acetat (**4**), Tetrahydrofuran-2-methyl-ester (**9**), 3-Hydroxybuttersäure-ethylester (**13**) und 4-Hydroxyisobuttersäure-methylester (**14**).

Herstellung der Substrate:

Die Acetate **1**, **2**, **4**, und **7** und das Butyrat **3**, ebenso wie die Methylester **8** und **9** wurden gemäß des folgenden Protokolls hergestellt:

Eine Lösung von Alkohol (10 mmol) in CH_2Cl_2 (10 ml) wurde mit Säreanhydrid (20 mmol) bei Raumtemperatur behandelt, anschließend wurden Pyridin (20 mmol) und eine katalytische Menge an 4-(Dimethylamino)-pyridin (Merck-Schuchardt) hinzugegeben. Alle Verbindungen wurden mittels Silicagel-Chromatographie oder Kugelrohr-Destillation gereinigt.

Die Carbonsäure (10 mmol) wurde mit einer katalytischen Menge H_2SO_4 (conc.) und einem 10-fachen Überschuß Methanol im Rückflussverfahren geführt. Alle Ester wurden mittels Silicagel-Chromatograpie oder Kugelrohrdestillation gereinigt.

Substrat **6**

Die Aminogruppe (±)-2-Phthalimido-1-butanol (**6**) (Kumar et al. 1997) wurde nach Standard-Schutzgruppeverfahren geschützt:

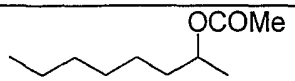
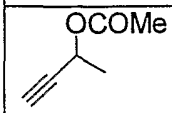
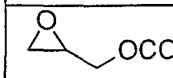
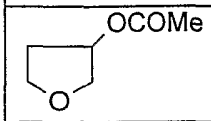
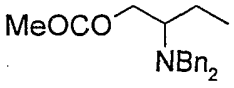
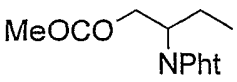
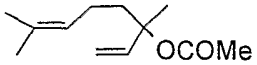
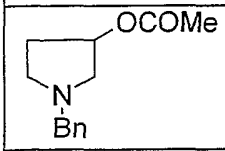
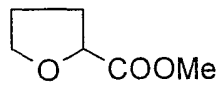
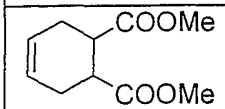
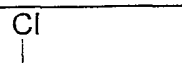
Phthalsäureanhydrid (50 mmol; 7,4 g) und 2-Amino-1-butanol (45,5 mmol; 4,05g) wurden bei einer Temperatur von 140°C geschmolzen. Die Reaktionsmischung wurde mit 200 ml CH_2Cl_2 verdünnt und mit $NaHCO_3$ (4 x 100 ml) und Wasser (4 x 500 ml) gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 erfolgte Acetylierung des Rohproduktes und anschließend Reinigung.

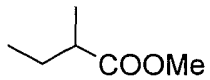
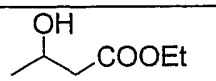
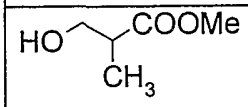
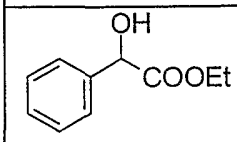
Das Acetat wurde nach dem folgenden Verfahren hergestellt:

Eine Lösung von Alkohol (28,5 mmol; 6,26 g) in CH_2Cl_2 (10 ml) wurde mit Säureanhydrid (57,1 mmol; 4,52 g) behandelt, anschließend mit Pyridin (57,1 mmol; 4,52 g) und mit einer katalytischen Menge an 4-(Dimethylamino)-pyridin (Merck-Schuchardt) bei Raumtemperatur für 5 Stunden. Zusätzlich wurde eine stöchiometrische Menge Methanol hinzugegeben, um den Überschuß an Säureanhydrid zu zerstören, und die so erhaltene Mischung wurde für 4 Stunden

gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit HCl 0.5 N (2 x 40 ml), $NaHCO_3$ (2 x 50 ml) und Wasser (1 x 50 ml) gewaschen. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurde das erhaltene Acetat mittels Silicagel-Chromatographie gereinigt (Benzin: Ethylacetat = 2:1).

Tabelle 4: Übersicht über einige der getesteten Substrate

	Octanyl-2-acetat	**1**
	1-Butin-3-acetat	**2**
	Glycidyl-butyrat	**3**
	Tetrahydrofuran-3-acetat	**4**
	2-Dibenzyl-amino-butyl-acetat	**5**
	1-Acetoxy-2-phthalimido-butan	**6**
	Linalyl-acetat	**7**
	N-Benzyl-3-acetoxy- pyrrolidin	**8**
	Tetrahydrofuran-2-methylester	**9**
	cis-4-Cyclohexen-1,2-dicarbonsäure-dimethylester	**10**
	2-Chlor-propion-säure-2-naphthyl-ester	**11**

	2-Methyl-butter-säure-methylester	**12**
	3-Hydroxy-butter-säure-ethylester	**13**
	4-Hydroxy-isobuttersäure-methylester	**14**
	(R)+(S)-Mandelsäure-ethylester	**15,16**

Literatur

[1] U.T. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, Hydrolases in OrganicSynthesis – Regio- and Stereoselective Biotransformations, Wiley-VCH: Weinheim (1999)

[2] K. Faber, Biotransformations in Organic Chemistry, 4th ed.; Springer: Berlin (2000)

[3] Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT, Biotechnol. App.l Biochem. 29 (1999) 119

[4] R.J. Kazlauskas, A.N.E. Weissfloch, A.T. Rappaport, L.A. Cuccia, J. Org. Chem. 56 (1991) 2656

[5] K. Takahashi, T. Yoshimoto, A. Ajima, Y. Tamaura, Y. Inada, Enzyme 32 (1984) 235

[6] T. Nishio, M. Kamimura, M. Murata, Y. Terao, K. Achiwa, J. Biochem. (Tokyo) 104 (1988) 81

[7] X.F. Kou, J.N. Xia, J.L. Xu, Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 16 (2000) 116

[8] M. Pogorevc, K. Faber, J. Mol. Catal. B: Enzym. 10 (2000) 357

[9] M. Baumann, B.H. Hauer, U.T. Bornscheuer, Tetrahedron Asymetry 11 (2000) 4781

[10] F.H. Arnold, Acc. Chem. Res. 31 (1998) 125

[11] J. Minshull, W.P. Stemmer, Curr. Opin. Chem. Biol. 3 (1999) 284

[12] E.I. Petersen, G. Valinger, B.Soelkner, G. Stubenrauch, H. Schwab, J. Biotech. (2001) in press

[13] B. Reiter, A. Glieder, D. Talker, H. Schwab, Appl. Microbiol. Biotechnol 54 (2000) 778

[14] A. Schlacher, T. Stanzer, I. Osprian, M. Mischitz, E. Klingsbichel, K. Faber, H. Schwab, J. Biotechnol. 1998 Jun 11;62(1):47-54.

[15] A. Schlacher, T. Stanzer, B. Soelkner, E. Klingsbichel, E. Petersen, M. Schmidt, N. Klempier, H. Schwab, J. Mol. Catal. B: Enzym. 3 (1997) 25

[16] M. Gudelj, G. Valinger, K. Faber, H. Schwab, J. Mol. Catal. B: Enzym. 5 (1998) 261

[17] A. Hermetter, F. Paltauf, E. Zenzmaier, A. Schlacher, H. Schwab, K. Faber, in: New Frontiers for Microbial Catalysts (K. Kieslich, C.P. van der Beek, J. A. M. de Bont and W. J. J. van den Tweel, eds.) Elsevier, Amsterdam, (1997) 53

[18] D. Balzer, P. Bucher, K. Hofmann, Nucleic Acids Res 20 (1992) 1851

[19] H. Cho, J.E. Cronan Jr, J. Biol. Chem. 268 13 (1993) 9238

[20] P. Cosmina, F. Rodriguez, F. de Ferra, G. Grandi, M. Perego, G. Venema, D van Sinderen, Mol. Microbiol. 8 (1993) 821

[21] F. Peypoux, J.M. Bonmatin, J. Wallach, Appl. Microbiol. Biotechnol. 51 (1999) 553

[22] D. Konz, S. Doekel, M.A. Marahiel, J. Bacteriol. 181 (1999) 133

[23] H.D. Mootz, M.A. Marahiel, J. Bacteriol. 179 (1997) 6843

[24] D. Konz, A. Klens, K. Schorgendorfer, M.A. Marahiel, Chem Biol. 4 (1997) 927

[25] J.W. Trauger, R.M. Kohli, H.D. Mootz, M.A. Marahiel, C.T. Walsh, Nature 407 (2000) 215

[26] R.S. Gokhale, D. Hunziker, D.E. Cane, C. Koshla, Chem. Biol. 6 (1998) 117

[27] R. Aggarwal, P. Caffrey, P.F. Leadlay, C.J.Smith, J. Staunton, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 15 (1995) 1519

[28] A. Schneider, M.A. Marahiel, Arch. Microbiol. 169 (1998) 404

[29] P. Cosmina, F. Rodriguez, F. de Ferra, G. Grandi, M. Perego, G. Venema, D. van Sinderen, Mol. Microbiol. 8 (1993) 821

[30] L.A. Kelley, R.M. MacCallum, M.J.E. Sternberg, J. Mol. Biol. 299 (2000) 501

[31] N. Battchikova, M. Koivulehto, A. Denesyuk, L. Ptitsyn, Y. Boretsky, J. Hellman, T. Korpela, J. Biochem.120 (1996) 425

Patentansprüche

1. Polynukleotid ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
   a) Polynukleotid mit einer Nukleinsäuresequenz von Position 556 bis 1287 gemäß SEQ ID No. 1,
   b) Polynukleotide kodierend für ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 2,
   c) natürlicherweise vorkommende oder künstlich erzeugte Mutanten oder polymorphe Formen oder Allele eines Polynukleotids gemäß (a) oder (b),
   d) zu einem Polynukleotid gemäß (a), (b) oder (c) komplementäre Polynukleotide,
   e) Polynukleotide, die unter stringenten Bedingungen mit einem Polynukleotid gemäß (a), (b), (c) oder (d) hybridisieren,
   f) Polynukleotide mit einer Sequenzhomologie oder –identität von mindestens 50 % in Bezug auf ein Polynukleotid gemäß (a), (b), (c), (d) oder (e),
   g) Polynukleotide, die aus mindestens 10 aufeinanderfolgenden Nukleinsäuren einer Nukleinsäure gemäß (a), (b), (c), (d) oder (e) bestehen,
   h) Polynukleotide mit Deletionen oder Insertionen von bis zu 50 Nukleinsäuren gegenüber einer Nukleinsäure gemäß (a), (b), (c), (d) oder (e),
   i) Polynukleotide, die mindestens eine der unter (a) bis (h) genannten Nukleinsäuren umfassen.

2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, kodierend für ein Enzym mit hydrolytischer Aktivität.

3. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, kodierend für ein Enzym mit esterolytischer oder lipolytischer Aktivität.

4. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei es sich bei dem Enzym um ein Enzym mit alpha/beta-Hydrolase-Faltung handelt.

5. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei es sich bei dem Enzym um eine Esterase, Thioesterase, Dehalogenase, Halogenperoxidase, Epoxidhydrolase oder Lipase handelt.

6. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei es sich bei dem Enzym um die Esterase Est4B1 gemäß SEQ ID No. 2 handelt.

7. Nukleinsäure nach Anspruch 1, wobei die Nukleinsäure eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen umfasst.

8. Verfahren zur Herstellung und/oder Identifizierung einer Nukleinsäure gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure chemisch synthetisiert, anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert, durch Polymerase-Kettenreaktion und/oder durch Mutagenese-Experimente erhalten wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, folgende Schritte umfassend:
   a) eine Nukleinsäure-Bibliothek wird mit einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 kontaktiert,
   b) eine Nukleinsäure, die mit einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 hybridisiert, wird identifiziert,
   c) die in Schritt (b) identifizierte Nukleinsäure wird sequenziert.

10. Verfahren nach Anspruch 8, folgende Schritte umfassend:
   a) ausgehend von einer Nukleinsäure gemäß SEQ ID No. 1 werden Primer hergestellt,
   b) die Primer gemäß (a) werden verwendet, um in der PCR Nukleinsäuren unbekannter Nukleinsäuresequenz zu amplifizieren,
   c) die gemäß (b) erhaltenen Nukleinsäuren werden sequenziert.

11. Verfahren nach Anspruch 8, folgende Schritte umfassend:
   a) eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 wird Mutagenese-Experimenten unterworfen,

b) die erhaltenen Mutanten werden sequenziert, in einen geeigneten Vektor eingebaut und exprimiert,

c) die Expressionsprodukte gemäß (b) werden auf hydrolytische Aktivität hin untersucht.

12. Verfahren nach Anspruch 8, folgende Schritte umfassend:

a) Nukleinsäuren einer Bibliothek werden in geeignete Vektoren eingebaut und diese in passende Wirtsorganismen, vorzugsweise Bakterien, insbesondere *E. coli*, eingebracht, so daß die Expression der Nukleinsäuren erfolgen kann,

b) die gemäß (a) erhaltenen Wirtsorganismen werden auf einem festen Träger, vorzugsweise einer Agar-Platte, ausplattiert und inkubiert,

c) auf dem festen Träger wird ein Assay, beispielsweise eine Farbreaktion, durchgeführt, der die Umsetzung eines Hydrolase-Substrats, beispielsweise Naphthylacetat, involviert,

d) Hydrolase-positive Klone werden identifiziert, beispielsweise durch visuelle Beobachtung, durch automatisierte Imageanalyse oder mittels photometrischer Messung, und gereinigt,

e) die Nukleinsäuren aus den in Schritt (d) identifizierten Klonen werden sequenziert.

13. Vektor umfassend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1.

14. Wirtszelle umfassend einen Vektor gemäß Anspruch 13.

15. Wirtszelle nach Anspruch 14, wobei es sich bei der Wirtszelle um *Bacillus subtilis* oder *E. coli* handelt.

16. Polypeptid ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

a) Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 2,

b) natürlicherweise vorkommende oder künstlich erzeugte Mutanten, polymorphe Formen oder Allele eines Polypeptid gemäß (a),

c) Polypeptide, die eine Sequenzhomologie oder -identität von mindestens 50 % in Bezug auf ein Polypeptid gemäß (a) oder (b) besitzen,

d) Polypeptide, die von Nukleinsäuren gemäß Anspruch 1 kodiert werden,

e) Polypeptide bestehend aus mindestens 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren eines Polypeptids gemäß (a) oder (b),

f) Polypeptide mit Insertionen und/oder Deletionen von bis zu 60 Aminosäuren in Bezug auf ein Polypeptid gemäß (a), (b) oder (c),

g) Polypeptide, die mindestens eines der unter (a) bis (f) genannten Polypeptide umfassen.

17. Polypeptid nach Anspruch 16, wobei es sich bei dem Polypeptid um ein Protein mit hydrolytischer Aktivität handelt.

18. Polypeptid nach Anspruch 17, wobei es sich bei dem Polypeptid um ein lipolytisches oder esterolytisches Enzym handelt.

19. Polypeptid nach Anspruch 16, wobei es sich bei dem Polypeptid um eine Esterase, Thioesterase, Dehalogenase, Halogenperoxidase, Epoxidhydrolase oder Lipase handelt.

20. Polypeptid nach Anspruch 16, wobei es sich bei dem Polypeptid um ein Enzym mit alpha/beta-Hydrolase-Faltung handelt.

21. Polypeptid nach Anspruch 16, wobei es sich bei dem Polypeptid um die Esterase Est4B1 gemäß SEQ ID No. 2 handelt.

22. Polypeptid nach Anspruch 16, wobei es sich um ein wasserlösliches Protein handelt.

23. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert wird.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei es sich bei der Wirtszelle um *Bacillus subtilis* oder *E. coli* handelt.

25. Verfahren nach Anspruch 24, folgende Schritte umfassend:
    a) eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 wird in einen geeigneten Vektor eingebaut und *E. coli* wird mit dem Vektor transformiert,
    b) nach der Expression des Proteins werden die Zellen geerntet und aufgeschlossen,
    c) das Protein wird aus dem so erhaltenen Überstand aufgereinigt.

26. Antikörper gegen ein Polypeptid gemäß Anspruch 16.

27. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass ein Säugetier mit einem Polypeptid gemäß Anspruch 16 immunisiert wird und gegebenenfalls die entstandenen Antikörper isoliert werden.

28. Testsystem zur Identifizierung von Substraten oder funktionellen Interaktoren enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1, ein Polypeptid gemäß Anspruch 16 und/oder einen Antikörper gemäß Anspruch 26 und gegebenenfalls geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe.

29. Verwendung eines Polypeptids gemäß Anspruch 16 zur Spaltung oder Herstellung von Verbindungen mit Halogenalkan-, Ester-, Thioester-, Amid-, Halid- oder Peptid-Bindungen.

30. Verwendung eines Polynukleotids gemäß Anspruch 1 zur Herstellung heterologer Nukleinsäuren mit verbesserten Expressionseigenschaften.

31. Verfahren zur Herstellung von heterologen Expressionskonstrukten kodierend für ein Enzym mit hydrolytischer Aktivität, folgende Schritte umfassend:
    a) eine Nukleinsäure umfassend ein Polynukleotid kodierend für ein Enzym mit hydrolytischer Aktivität wird vorgelegt,

b) der 5'-terminale Teilbereich des Polynukleotids gemäß (a) wird vollständig oder teilweise durch ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 ersetzt.

32. Verwendung eines Polynukleotids gemäß Anspruch 1, eines Polypeptids gemäß Anspruch 16 und/oder eines Antikörpers gemäß Anspruch 26 zur Bekämpfung von Pflanzenpathogenen und/oder Pflanzenschädlingen.

33. Zusammensetzung zur Bekämpfung von Pflanzenpathogenen und/oder Pflanzenschädlingen, enthaltend mindestens ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 und/oder mindestens ein Polypeptid gemäß Anspruch 16 und/oder mindestens einen Antikörper gemäß Anspruch 26 und geeignete Hilfs- und/oder Zusatzstoffe.

34. Pflanze und/oder pflanzliche Zelle, enthaltend mindestens ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 und/oder mindestens ein Polypeptid gemäß Anspruch 16 und/oder mindestens einen Antikörper gemäß Anspruch 26.

35. Kristalle, enthaltend mindestens ein Polypeptid gemäß Anspruch 16.

Fig. 1

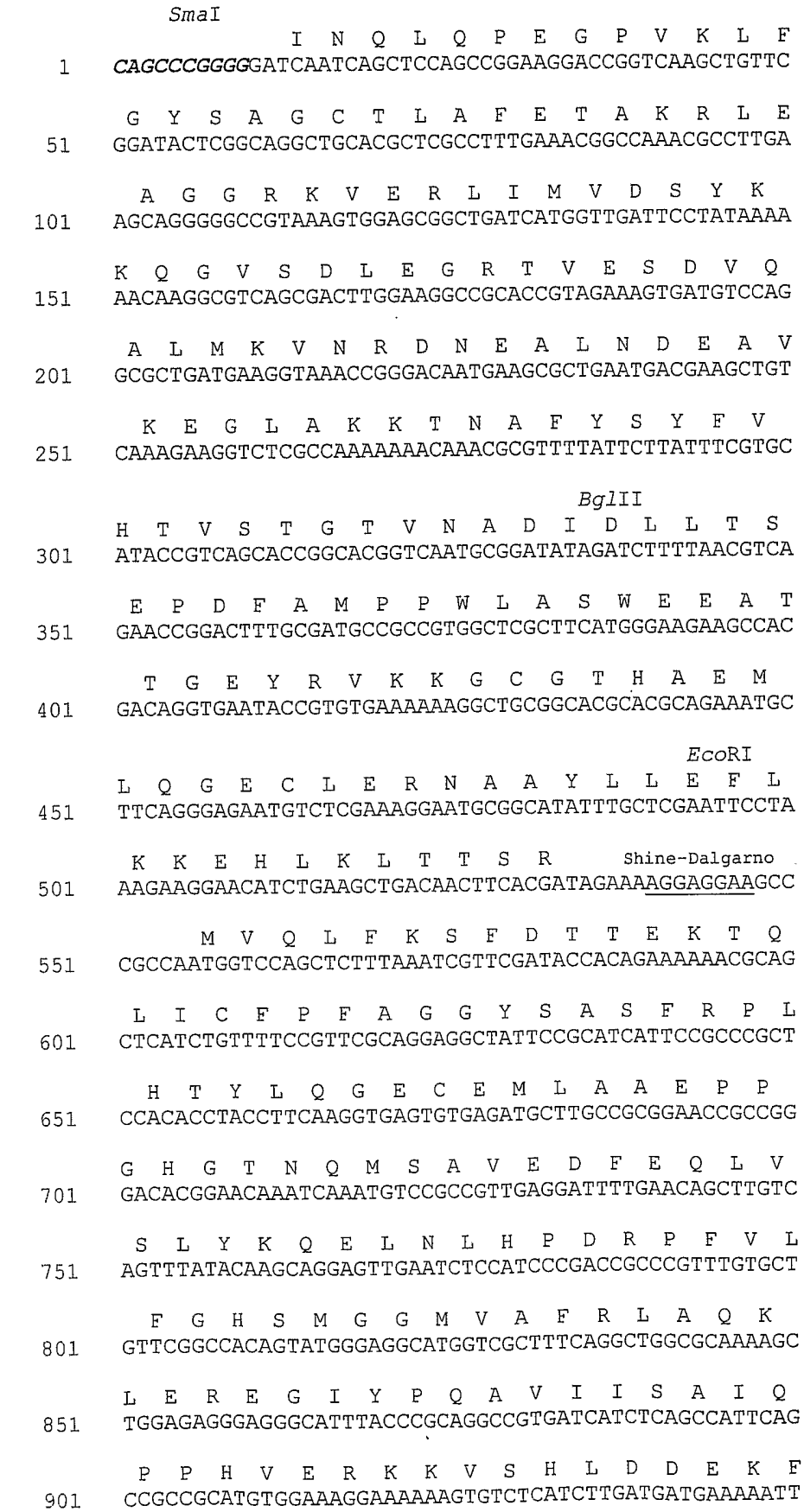

SmaI
I N Q L Q P E G P V K L F
1 CAGCCCGGGGGATCAATCAGCTCCAGCCGGAAGGACCGGTCAAGCTGTTC
G Y S A G C T L A F E T A K R L E
51 GGATACTCGGCAGGCTGCACGCTCGCCTTTGAAACGGCCAAACGCCTTGA
A G G R K V E R L I M V D S Y K
101 AGCAGGGGGCCGTAAAGTGGAGCGGCTGATCATGGTTGATTCCTATAAAA
K Q G V S D L E G R T V E S D V Q
151 AACAAGGCGTCAGCGACTTGGAAGGCCGCACCGTAGAAAGTGATGTCCAG
A L M K V N R D N E A L N D E A V
201 GCGCTGATGAAGGTAAACCGGGACAATGAAGCGCTGAATGACGAAGCTGT
K E G L A K K T N A F Y S Y F V
251 CAAAGAAGGTCTCGCCAAAAAAACAAACGCGTTTTATTCTTATTTCGTGC
BglII
H T V S T G T V N A D I D L L T S
301 ATACCGTCAGCACCGGCACGGTCAATGCGGATATAGATCTTTTAACGTCA
E P D F A M P P W L A S W E E A T
351 GAACCGGACTTTGCGATGCCGCCGTGGCTCGCTTCATGGGAAGAAGCCAC
T G E Y R V K K G C G T H A E M
401 GACAGGTGAATACCGTGTGAAAAAAGGCTGCGGCACGCACGCAGAAATGC
EcoRI
L Q G E C L E R N A A Y L L E F L
451 TTCAGGGAGAATGTCTCGAAAGGAATGCGGCATATTTGCTCGAATTCCTA
K K E H L K L T T S R Shine-Dalgarno
501 AAGAAGGAACATCTGAAGCTGACAACTTCACGATAGAAAAGGAGGAAGCC
M V Q L F K S F D T T E K T Q
551 CGCCAATGGTCCAGCTCTTTAAATCGTTCGATACCACAGAAAAAACGCAG
L I C F P F A G G Y S A S F R P L
601 CTCATCTGTTTTCCGTTCGCAGGAGGCTATTCCGCATCATTCCGCCCGCT
H T Y L Q G E C E M L A A E P P
651 CCACACCTACCTTCAAGGTGAGTGTGAGATGCTTGCCGCGGAACCGCCGG
G H G T N Q M S A V E D F E Q L V
701 GACACGGAACAAATCAAATGTCCGCCGTTGAGGATTTTGAACAGCTTGTC
S L Y K Q E L N L H P D R P F V L
751 AGTTTATACAAGCAGGAGTTGAATCTCCATCCCGACCGCCCGTTTGTGCT
F G H S M G G M V A F R L A Q K
801 GTTCGGCCACAGTATGGGAGGCATGGTCGCTTTCAGGCTGGCGCAAAAGC
L E R E G I Y P Q A V I I S A I Q
851 TGGAGAGGGAGGGCATTTACCCGCAGGCCGTGATCATCTCAGCCATTCAG
P P H V E R K K V S H L D D E K F
901 CCGCCGCATGTGGAAAGGAAAAAAGTGTCTCATCTTGATGATGAAAAATT

Fig. 1 (Fortsetzung)

```
          L  A  H  I  I  E  L  G  G  M  P  Q  E  L  V  E
  951     TCTCGCCCATATTATCGAGCTTGGCGGAATGCCGCAGGAGTTAGTGGAGA

          N  K  E  V  M  S  F  F  L  P  S  F  R  S  D  Y  R
 1001     ATAAGGAGGTCATGTCATTTTTCCTGCCTTCTTTCAGATCCGACTACCGC

                  HindIII
          A  L  E  S  F  R  P  S  D  S  H  I  I  Q  S  P  V
 1051     GCGCTTGAAAGCTTCCGTCCGTCTGATTCTCACATCATTCAATCACCCGT

          H  I  F  N  G  R  K  D  K  K  C  I  K  D  A  D
 1101     CCATATTTTTAACGGGCGGAAGGATAAAAAATGTATCAAAGATGCGGACG

          G  W  K  K  W  A  D  N  P  V  F  H  E  F  S  D  G
 1151     GATGGAAAAAAATGGGCCGACAATCCCGTATTTCATGAGTTTTCGGACGGC

          H  M  F  I  L  S  E  T  E  K  V  A  E  R  I  Y  E
 1201     CACATGTTCATATTAAGTGAAACTGAAAAAGTGGCGGAACGAATCTATGA

                        PstI
          I  I  N  R  S  T  A  G  Q  L  L
 1251     GATTATTAACAGGAGCACTGCAGGCCAATTGTTATAGGATATGACAGACA

 1301     GCATTCGCTGTCTGTTTTTTGTAACAAAATCTGCCCGCGAGTTTTCTCAT

 1351     TTATCAAAAATTTTATGTTATGATTTGATGGAATATAATTTTGAAGGGAT

                   M  N  D  A  A  K  E  L  N  R  T  L  S  E
 1401     TGTCGTACATGAATGATGCAGCAAAAGAGCTGAACAGAACATTATCTGAA

                        NdeI
          E  N  P  H  V  L  H  M  L  S  D  L  G  R  E  L  F
 1451     GAAAACCCGCACGTGCTTCATATGCTTTCTGATTTGGGCAGAGAGTTGTT

          Y  P  K  G  V  L  T  Q  S  A  E  A  K  A  K  A
 1501     TTATCCGAAAGGGGTGCTGACACAATCGGCGGAAGCGAAAGCCAAGGCCG

          G  K  Y  N  A  T  I  G  I  A  T  S  Q  G  E  S  M
 1551     GAAAGTATAATGCCACGATCGGAATCGCCACCTCACAGGGCGAGTCCATG

          H  F  S  H  I  Q  E  T  L  S  A  Y  N  P  D  D  I
 1601     CACTTTTCCCATATTCAAGAGACACTGTCCGCCTATAACCCCGATGATAT

          Y  D  Y  A  P  P  Q  G  K  E  P  L  R  Q  E  W
 1651     CTACGATTATGCTCCGCCGCAGGGAAAAGAGCCGCTCAGACAGGAATGGC

          L  K  K  M  R  L  E  N  P  S  L  A  G  K  D  I  S
 1701     TGAAAAAAATGCGTCTCGAAAATCCTTCATTAGCCGGCAAAGACATCAGC

          T  P  I  V  T  N  A  L  T  H  G  L  S  I  A  A  D
 1751     ACGCCGATCGTGACAAACGCTTTAACACACGGGCTGAGCATCGCCGCCGA

          L  F  V  N  E  G  D  T  L  L  L  P  D  K  Y  W
 1801     CTTGTTCGTCAATGAAGGGGATACGCTGCTTCTGCCTGATAAATATTGGG

          G  N  Y  N  F  I  F  G  V  R  R  K  A  S  I  E  T
 1851     GAAATTACAATTTCATTTTCGGTGTCCGGCGCAAGGCATCAATTGAGACG
```

Fig. 1 (Fortsetzung)

```
          Y  P  L  F  Q  Q  D  G  R  F  N  A  A  G  L  S  E
1901      TACCCGCTTTTTCAGCAGGATGGGCGTTTTAATGCGGCGGGGCTGTCCGA

            L  L  K  K  Q  E  E  K  A  I  V  V  L  N  F  P
1951      GCTGCTGAAAAAGCAGGAAGAAAAGGCGATTGTCGTGCTGAATTTCCCGA

          N  N  P  T  G  Y  T  P  G  E  E  E  A  A  E  I  V
2001      ATAATCCGACAGGCTACACGCCGGGAGAAGAGGAAGCGGCAGAAATCGTC
            S  V  I  L  E  A  A  E  A  G  K  E  I  V  V  L  V
2051      AGCGTGATCCTGGAGGCGGCGGAGGCCGGCAAAGAGATTGTCGTGCTCGT

                                                    SpeI
            D  D  A  Y  Y  N  L  F  Y  D  E
2101      AGACGATGCGTATTACAATCTGTTTTACGATGAAAACTAGTTCT
```

Fig. 2

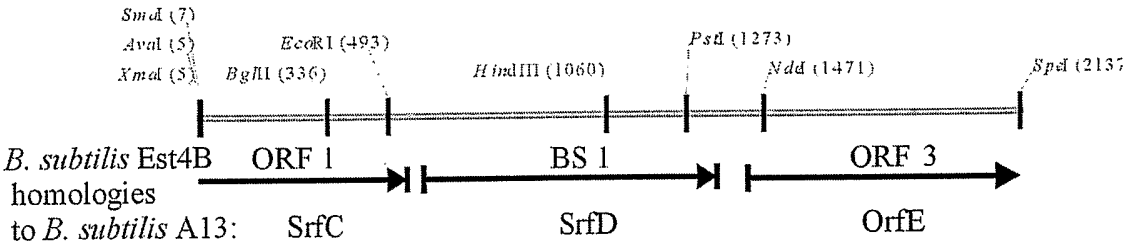


Fig. 3

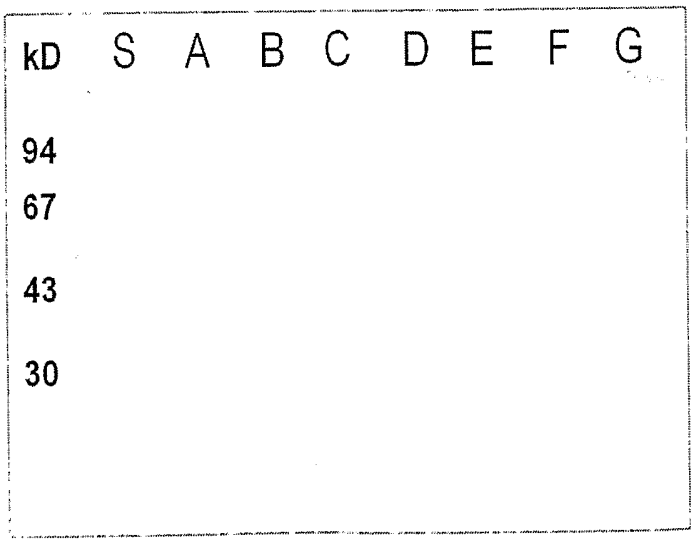


Fig. 4



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

<120> Esterase Est4B1 aus Bacillus subtilis

<130> 201dg01.de

<140>
<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 2144
<212> DNA
<213> Bacillus subtilis

<220>
<221> CDS
<222> (556)..(1287)

<400> 1
cagcccgggg gatcaatcag ctccagccgg aaggaccggt caagctgttc ggatactcgg 60

caggctgcac gctcgccttt gaaacggcca aacgccttga agcaggggge cgtaaagtgg 120

agcggctgat catggttgat tcctataaaa aacaaggcgt cagcgacttg gaaggccgca 180

ccgtagaaag tgatgtccag gcgctgatga aggtaaaccg ggacaatgaa gcgctgaatg 240

acgaagctgt caaagaaggt ctcgccaaaa aaacaaacgc gttttattct tatttcgtgc 300

ataccgtcag caccggcacg gtcaatgcgg atatagatct tttaacgtca gaaccggact 360

ttgcgatgcc gccgtggctc gcttcatggg aagaagccac gacaggtgaa taccgtgtga 420

aaaaaggctg cggcacgcac gcagaaatgc ttcagggaga atgtctcgaa aggaatgcgg 480

catatttgct cgaattccta aagaaggaac atctgaagct gacaacttca cgatagaaaa 540

ggaggaagcc cgcca atg gtc cag ctc ttt aaa tcg ttc gat acc aca gaa 591
Met Val Gln Leu Phe Lys Ser Phe Asp Thr Thr Glu
1 5 10

aaa acg cag ctc atc tgt ttt ccg ttc gca gga ggc tat tcc gca tca 639

```
Lys Thr Gln Leu Ile Cys Phe Pro Phe Ala Gly Gly Tyr Ser Ala Ser
         15                  20                  25

ttc cgc ccg ctc cac acc tac ctt caa ggt gag tgt gag atg ctt gcc   687
Phe Arg Pro Leu His Thr Tyr Leu Gln Gly Glu Cys Glu Met Leu Ala
     30                  35                  40

gcg gaa ccg ccg gga cac gga aca aat caa atg tcc gcc gtt gag gat   735
Ala Glu Pro Pro Gly His Gly Thr Asn Gln Met Ser Ala Val Glu Asp
 45                  50                  55                  60

ttt gaa cag ctt gtc agt tta tac aag cag gag ttg aat ctc cat ccc   783
Phe Glu Gln Leu Val Ser Leu Tyr Lys Gln Glu Leu Asn Leu His Pro
                 65                  70                  75

gac cgc ccg ttt gtg ctg ttc ggc cac agt atg gga ggc atg gtc gct   831
Asp Arg Pro Phe Val Leu Phe Gly His Ser Met Gly Gly Met Val Ala
             80                  85                  90

ttc agg ctg gcg caa aag ctg gag agg gag ggc att tac ccg cag gcc   879
Phe Arg Leu Ala Gln Lys Leu Glu Arg Glu Gly Ile Tyr Pro Gln Ala
         95                 100                 105

gtg atc atc tca gcc att cag ccg ccg cat gtg gaa agg aaa aaa gtg   927
Val Ile Ile Ser Ala Ile Gln Pro Pro His Val Glu Arg Lys Lys Val
    110                 115                 120

tct cat ctt gat gat gaa aaa ttt ctc gcc cat att atc gag ctt ggc   975
Ser His Leu Asp Asp Glu Lys Phe Leu Ala His Ile Ile Glu Leu Gly
125                 130                 135                 140

gga atg ccg cag gag tta gtg gag aat aag gag gtc atg tca ttt ttc   1023
Gly Met Pro Gln Glu Leu Val Glu Asn Lys Glu Val Met Ser Phe Phe
                145                 150                 155

ctg cct tct ttc aga tcc gac tac cgc gcg ctt gaa agc ttc cgt ccg   1071
Leu Pro Ser Phe Arg Ser Asp Tyr Arg Ala Leu Glu Ser Phe Arg Pro
            160                 165                 170

tct gat tct cac atc att caa tca ccc gtc cat att ttt aac ggg cgg   1119
Ser Asp Ser His Ile Ile Gln Ser Pro Val His Ile Phe Asn Gly Arg
        175                 180                 185

aag gat aaa aaa tgt atc aaa gat gcg gac gga tgg aaa aaa tgg gcc   1167
Lys Asp Lys Lys Cys Ile Lys Asp Ala Asp Gly Trp Lys Lys Trp Ala
    190                 195                 200

gac aat ccc gta ttt cat gag ttt tcg gac ggc cac atg ttc ata tta   1215
```

```
Asp Asn Pro Val Phe His Glu Phe Ser Asp Gly His Met Phe Ile Leu
205                 210                 215                 220

agt gaa act gaa aaa gtg gcg gaa cga atc tat gag att att aac agg   1263
Ser Glu Thr Glu Lys Val Ala Glu Arg Ile Tyr Glu Ile Ile Asn Arg
                225                 230                 235

agc act gca ggc caa ttg tta tag gatatgacag acagcattcg ctgtctgttt  1317
Ser Thr Ala Gly Gln Leu Leu
            240

tttgtaacaa aatctgcccg cgagttttct catttatcaa aaattttatg ttatgatttg 1377

atggaatata attttgaagg gattgtcgta catgaatgat gcagcaaaag agctgaacag 1437

aacattatct gaagaaaacc cgcacgtgct tcatatgctt tctgatttgg gcagagagtt 1497

gttttatccg aaaggggtgc tgacacaatc ggcggaagcg aaagccaagg ccggaaagta 1557

taatgccacg atcggaatcg ccacctcaca gggcgagtcc atgcactttt cccatattca 1617

agagacactg tccgcctata accccgatga tatctacgat tatgctccgc cgcagggaaa 1677

agagccgctc agacaggaat ggctgaaaaa aatgcgtctc gaaaatcctt cattagccgg 1737

caaagacatc agcacgccga tcgtgacaaa cgctttaaca cacgggctga gcatcgccgc 1797

cgacttgttc gtcaatgaag gggatacgct gcttctgcct gataaatatt ggggaaatta 1857

caatttcatt ttcggtgtcc ggcgcaaggc atcaattgag acgtacccgc tttttcagca 1917

ggatgggcgt tttaatgcgg cggggctgtc cgagctgctg aaaaagcagg aagaaaaggc 1977

gattgtcgtg ctgaatttcc cgaataatcc gacaggctac acgccgggag aagaggaagc 2037

ggcagaaatc gtcagcgtga tcctggaggc ggcggaggcc ggcaaagaga ttgtcgtgct 2097

cgtagacgat gcgtattaca atctgtttta cgatgaaaac tagttct               2144
```

<210> 2
<211> 243
<212> PRT
<213> Bacillus subtilis

<400> 2

```
Met Val Gln Leu Phe Lys Ser Phe Asp Thr Thr Glu Lys Thr Gln Leu
  1               5                  10                  15
```

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

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 3
gaacacacat atggtccagc tc 22

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 4
agcgcatgct gtctgtcata tc 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interi ıal Application No
PCT/EP 02/09289

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N9/16 C12N15/82 C07K16/12 C12Q1/44 C12N15/00

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)
IPC 7 C12N C07K 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)
EMBL, EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 24 July 2000 (2000-07-24) CONRAD ET AL.: "Putative thioesterase (srfD)" retrieved from EBI Database accession no. AF233756 XP002222535 cited in the application Mit Ausnahme von Position 205 identische Polypeptidsequenz. abstract --- -/--	1-35

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[ ] Patent family members are listed in 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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 November 2002	11/12/2002

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Friedrich, C

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHNEIDER A ET AL: "GENETIC EVIDENCE FOR A ROLE OF THIOESTERASE DOMAINS, INTEGRATED IN OR ASSOCIATED WITH PEPTIDE SYNTHETASES, IN NON-RIBOSOMAL PEPTIDE BIOSYNTHESIS IN BACILLUS SUBTILIS" ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, BERLIN, DE, vol. 169, no. 5, 1998, pages 404-410, XP000925848 ISSN: 0302-8933 the whole document ---	1-35
A	PODILE A R ET AL: "SEED BACTERIZATION WITH BACILLUS SUBTILIS AF 1 INCREASES PHENYLALANINE AMMONIALYASE AND REDUCES THE INCIDENCE OF FUSARIAL WILT IN PIGEONPEA" JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY - PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT, BLACKWELL, BERLIN, DE, vol. 146, no. 5/6, 1998, pages 255-259, XP000919127 ISSN: 0931-1785 the whole document -----	32-35

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/EP 02/09289

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N9/16 C12N15/82 C07K16/12 C12Q1/44 C12N15/00

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N C07K 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)
EMBL, EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! 24. Juli 2000 (2000-07-24) CONRAD ET AL.: "Putative thioesterase (srfD)" retrieved from EBI Database accession no. AF233756 XP002222535 in der Anmeldung erwähnt Mit Ausnahme von Position 205 identische Polypeptidsequenz. Zusammenfassung --- -/--	1-35

[X] 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
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
27. November 2002	11/12/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Friedrich, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internes Aktenzeichen
PCT/EP 02/09289

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SCHNEIDER A ET AL: "GENETIC EVIDENCE FOR A ROLE OF THIOESTERASE DOMAINS, INTEGRATED IN OR ASSOCIATED WITH PEPTIDE SYNTHETASES, IN NON-RIBOSOMAL PEPTIDE BIOSYNTHESIS IN BACILLUS SUBTILIS" ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, BERLIN, DE, Bd. 169, Nr. 5, 1998, Seiten 404-410, XP000925848 ISSN: 0302-8933 das ganze Dokument ---	1-35
A	PODILE A R ET AL: "SEED BACTERIZATION WITH BACILLUS SUBTILIS AF 1 INCREASES PHENYLALANINE AMMONIALYASE AND REDUCES THE INCIDENCE OF FUSARIAL WILT IN PIGEONPEA" JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY - PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT, BLACKWELL, BERLIN, DE, Bd. 146, Nr. 5/6, 1998, Seiten 255-259, XP000919127 ISSN: 0931-1785 das ganze Dokument -----	32-35