



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 31 970 T2 2005.12.29**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 948 615 B1**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/10**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 31 970.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK97/00567**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 948 747.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/028416**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.12.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **02.07.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.10.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **15.12.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.12.2005**

(30) Unionspriorität:

147196	20.12.1996	DK
59297	23.05.1997	DK
93597	14.08.1997	DK

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(72) Erfinder:

**BJORNVAD, Eskelund, Mads, DK-2880 Bagsvaerd,
DK; RASMUSSEN, Dolberg, Michael, DK-2880
Bagsvaerd, DK; JORGENSEN, Lina, Per, DK-2880
Bagsvaerd, DK; BORCHERT, Vedel, Torben,
DK-2880 Bagsvaerd, DK; EHRLICH, Stanislas
Dusko, F-75013 Paris, FR**

(74) Vertreter:

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

(54) Bezeichnung: **IN VIVO REKOMBINATION**

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

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

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur In-Vivo-Rekombination homologer DNA-Sequenzen. Dieses Verfahren ist eine erzwungene, künstliche Evolution, die zu einer DNA-Sequenz führt, die ein Polypeptid kodiert, das eine vorteilhafte Eigenschaft hat.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die homologe Rekombination zwischen DNA-Sequenzen, die auf demselben Plasmid angeordnet sind, ist dem Fachmann wohl bekannt (Weber und Weissmann, Nucl. Acid. Res. (1983) 11, 5661–5669). EP 252666 B1 (Novo Nordisk A/S), WO 95/22625 A1 (Affymax Technologies N. V.) und WO 9101087 offenbaren die In-Vivo-Rekombination von Genen, die auf demselben Plasmid angeordnet sind.

[0003] EP 449923 B1 (Setratech) offenbart ein Verfahren zur intergenischen Rekombination in vivo von teilweise homologen DNA-Sequenzen. Die Rekombination findet in Zellen statt, deren enzymatisches Fehlpaarungs-Reparatursystem gestört ist.

[0004] J. Biotechnol. (1991) 19, 221–240 offenbart ein Verfahren zur Inaktivierung eines Gens in dem Genom von *B. amyloliquefaciens*. Das Verfahren umfasst die Integration und Exzision einer pE194-Mutante.

[0005] In Chemical Abstracts 118: 161925 (1993) wird die für die Rekombination erforderliche minimale Sequenzlänge der Homologie bestimmt. Das Verfahren zur Bestimmung schließt die Integration eines pE194-Derivats, das ein Gluconasegen trägt, ein.

[0006] In J. Bacteriol. (1982) 152, 524–526 wird ein Plasmid pBD9 offenbart, das die beiden Plasmide pE194 und pUB110 von *Staphylococcus aureus* umfasst. Andere auf pE194 oder pUB110 basierende Plasmide sind in Molecular and General Genetics (1988), 213, 465–70, Molecular and General Genetics (1984), 195, 374–7, Plasmid (1981), 6, 67–77 und Genetika, (1986), 22, 2750–7 offenbart.

[0007] In Yichuan Xuebao (1993), 20, 272–8 (siehe Chemical Abstracts 120: 1670 (1994)) offenbaren Chen et. al. das Plasmid pNW102, ein pE194-Derivat, in dem das thermostabile α -Amylasegen aus *Bacillus licheniformis* inseriert ist. pNW102 wurde in den *Bacillus subtilis*-Stamm BF 7658 transformiert, gefolgt von Inkubation bei nicht-permissiver Temperatur, was die Rekombination zwischen den α -Amylasegenen von pNW102 und BF 7658 erlaubte. Die von den rekombinanten Stämmen produzierte α -Amylase zeigt dieselben Charakteristika wie die α -Amylase von *Bacillus licheniformis*.

[0008] Jedoch gibt es in dem verwandten Stand der Technik keinen Hinweis, dass DNA-Sequenzen durch Wiederholen von Integration und Auskreuzen in vivo rekombiniert werden können, um ein Gen zu erhalten, das ein Polypeptid mit verbesserten Merkmalen, wie z.B. verbesserter Stabilität, verbesserter Spezifität oder höherer Aktivität, kodiert.

[0009] Somit ist es eine Aufgabe der Erfindung, ein verbessertes In-Vivo-Verfahren zur Herstellung neuer DNA-Sequenzen bereitzustellen.

Kurze Beschreibung der Erfindung

[0010] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein In-Vivo-Verfahren zur Herstellung neuer DNA-Sequenzen. Es hat sich herausgestellt, dass neue DNA-Sequenzen mit verbesserten Eigenschaften auf eine schnelle und effiziente Weise aus wenigstens zwei homologen DNA-Sequenzen durch ein Verfahren hergestellt werden können, das den In-Vivo-Austausch von DNA zwischen wenigstens zwei Vektoren, von denen jeder eine homologe DNA-Sequenz und einen Replikationsursprung enthält, einschließt.

[0011] Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass der Austausch der homologen DNA-Sequenzen durch wenigstens einmaliges Wiederholen in vivo der Integration und des Ausschneidens eines Vektors in den anderen durchgeführt wird.

[0012] Somit bezieht sich ein erster Aspekt der Erfindung auf ein Verfahren zur In-Vivo-Rekombination homologer DNA-Sequenzen, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Inkubieren einer Zelle, die wenigstens zwei DNA-Strukturen enthält, die jede eine DNA-Sequenz und einen Replikationsursprung enthalten, unter Bedingungen, wobei i) wenigstens ein Replikationsursprung nicht-funktionell ist und ii) die Zelle unter einem Selektionsdruck steht, der ein Wachstum der Zelle nur erlaubt, falls sie die DNA-Struktur mit dem nicht-funktionellen Ursprung enthält, wodurch eine Integration einer der DNA-Strukturen in eine der anderen und dadurch die Bildung einer hybriden DNA-Struktur begünstigt wird;
- b) Verändern der Bedingungen zu Bedingungen, unter denen weniger Replikationsursprünge nicht-funktionell sind als in Schritt a), wodurch ein Auskreuzen aus der hybriden DNA-Struktur und die Bildung von DNA-Strukturen begünstigt wird, die eine rekombinierte DNA-Sequenz und einen Replikationsursprung umfassen; und
- c) wenigstens einmaliges Wiederholen der Schritte a)–b).

[0013] Einer der Vorteile des erfindungsgemäßen In-Vivo-Rekombinationsverfahrens ist, dass es durch Wiederholen des In-Vivo-Austausches zwischen den DNA-Sequenzen möglich ist, zahlreiche verschiedene Rekombinationsmuster zwischen den DNA-Sequenzen zu erhalten.

[0014] Dies ist in der [Fig. 1](#) veranschaulicht, die das Ergebnis der wie in Beispiel 1 beschriebenen durchgeführten In-Vivo-Rekombination zwischen den zwei DNA-Sequenzen Savinase und Savisyn zeigt.

[0015] In [Fig. 1](#) sind Savinase/Savisyn-rekombinierte Klone, wie z.B. die Klone Nr. 3, 8, 12, von mehr als einem In-Vivo-Rekombinationsereignis zwischen den beiden DNA-Sequenzen abgeleitet.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

[0016] [Fig. 1](#) veranschaulicht die Rekombination von zwei DNA-Sequenzen, die auf den Plasmiden pTR, temperaturempfindlich, da der Replikationsursprung bei 50°C funktionell ist, und pTS, temperatursensitiv, da der Replikationsursprung über 45°C nicht-funktionell ist, angeordnet sind. Unter nicht-permissiven Bedingungen (d.h. bei 50°C) integriert pTS in pTR, wobei ein Hybridplasmid gebildet wird.

[0017] [Fig. 2](#) veranschaulicht das Auskreuzen aus dem Hybridplasmid, wobei zwei neue DNA-Sequenzen gebildet werden, die jede auf einem Plasmid angeordnet sind. Ein wiederholtes Ein- und Auskreuzen kann z.B. durch zyklischen Temperaturwechsel oder einfach durch Aufrechterhalten des Temperaturdrucks und Selektieren auf die Resistenz von pTS (d.h. Erm[®]) durchgeführt werden.

[0018] [Fig. 3](#) veranschaulicht die Plasmide, die nach wiederholten Integrations- und Auskreuzungsereignissen erhalten werden.

[0019] Außerdem veranschaulichen die [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) ein DNA-Struktursystem, das für die In-Vivo-Messung der Hybridstrukturbildung geeignet ist und für die Durchführung eines erzwungenen Auskreuzens der DNA-Hybridstruktur geeignet ist.

[0020] [Fig. 1](#): DNA-Struktur pTS:

Geeigneter aktiver Promotor, der die Expression eines aktiven Proteins steuert

Erm[®]: Antibiotikum-Resistenzgen

Die DNA-Struktur pTR umfasst:

Keinerlei aktiven Promotor für die Steuerung der Transkription von GFP

GFP: Grün-fluoreszierendes Protein

[0021] Das Erm[®]-Antibiotikum-Resistenzgen in pTS ist wegen des aktiven Promotors aktiv.

[0022] Das GFP-Gen in pTR ist inaktiv (d.h. das Gen ist nicht-transkribiert), weil es keinen aktiven Promotor gibt, der die Expression des Gens antreibt.

[0023] [Fig. 2](#): Nach der Bildung der erfindungsgemäßen Hybridstruktur ist GFP nun aktiv (angetrieben von dem Promotor). Dies ermöglicht es, die Hybridstrukturbildung in vivo zu messen (siehe unten wegen weiterer Einzelheiten).

[0024] Im Gegensatz dazu ist das Erm[®]-Antibiotikum-Resistenzgen nun inaktiv (d.h. das Gen ist nicht-transkribiert), weil es keinen aktiven Promotor gibt, der die Expression des Gens antreibt. Das erzwungene Auskreuzen aus der DNA-Hybridstruktur wird durch Inkubieren der Zellen unter antibiotischem Druck durch Erm[®]

durchgeführt, wodurch ein Auskreuzen aus der DNA-Hybridstruktur erzwungen wird, weil die Zelle nur in der Lage ist, das Erm[®]-Antibiotikum-Resistenzgen zu exprimieren, nachdem das Auskreuzen aus der DNA-Struktur stattgefunden hat.

[0025] [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#): Sie illustrieren die zwei Vektoren pSX120 ([Fig. 4](#)) und pMB430 ([Fig. 5](#)), die, wie in Beispiel 1 beschrieben, verwendet werden, um die zwei DNA-Sequenzen Savinase und Savisyn in vivo zu rekombinieren.

[0026] pSX120 umfasst i) einen offenen Leserahmen, der die Savinase kodiert, ii) einen aktiven Promotor, der die Transkription der Savinase steuert, und iii) ein Gen, das Resistenz gegen Chloramphenicol (Cam[®]) verleiht.

[0027] pMB430 umfasst i) ein Savizyn-DNA-Fragment, ii) einen Terminator (der dazu führt, dass keine Transkription durch die auf ihn folgenden Regionen erfolgt), iii) ein Gen, das Resistenz gegenüber Erythromycin (Erm[®]) verleiht, und iv) einen offenen Leserahmen, der das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) kodiert.

[0028] [Fig. 6](#): Illustriert die Ergebnisse der wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführten In-Vivo-Rekombination von Savinase/Savisyn.

[0029] Die schematische Darstellung zeigt 12 der gemischten/rekombinierten Klone.

[0030] In horizontaler Richtung sind die Positionen der Restriktionsstellen angegeben, die nur in Savizyn vorkommen.

[0031] Der Buchstabe „S“ gibt an, dass die Sequenz an dieser Position identisch zu der Savinase-Sequenz ist, und der Buchstabe „Z“ gibt an, dass die Sequenz von Savizyn abstammt. Alle sequenzierten Klone sind in ihren Rekombinationsmustern unterschiedlich.

Definitionen

[0032] Wie hierin verwendet, haben die folgenden Ausdrücke die folgenden Bedeutungen:

Der Ausdruck „DNA-Sequenz“ schließt eine beliebige DNA-Sequenz ein, bei der es wünschenswert ist, sie gemäß der Erfindung zu modifizieren, z.B. eine DNA-Sequenz, die ein Polypeptid, zum Beispiel ein Enzym, pharmakologisch aktive Polypeptide, z.B. Insulin, Wachstumshormon, humane Hormone oder Wachstumsregulatoren, kodiert, und Sequenzen, wie z.B. Promotoren, Transkriptions- oder Translationsregulatoren, und andere intrazelluläre Polynukleotide und Polypeptide.

[0033] Der Begriff „homolog“ bedeutet, dass die DNA-Sequenzen einige Abschnitte identischer Nukleotide haben, die die Rekombination in vivo ermöglichen. Die besagten Abschnitte innerhalb der DNA-Sequenzen sind wengstens 15 Basenpaare lang, mehr bevorzugt wenigstens 25 Basenpaare lang, noch mehr bevorzugt wenigstens 50 Basen lang und am meisten bevorzugt wenigstens 150 Basenpaare oder mehr.

[0034] Der Ausdruck „homolog“ umfasst Abschnitte von DNA-Sequenzen, die ab 60% identisch mit DNA-Sequenzen sind, die sich nur in einem Nukleotid unterscheiden. Es ist bevorzugt, dass die Abschnitte von DNA-Sequenzen zu mehr als 70% identisch sind, mehr bevorzugt wenigstens 80%, speziell mehr als 90% identisch und mehr bevorzugt, dass die Abschnitte von DNA-Sequenzen zu 95%, am meisten bevorzugt zu wenigstens 97% identisch sind.

[0035] Innerhalb der interessierenden Abschnitte der DNA-Sequenzen wird die oben erwähnte DNA-Sequenzhomologie als der Grad der Identität zwischen zwei Sequenzen bestimmt, der eine Ableitung der ersten Sequenz von der zweiten anzeigt. Die Homologie kann geeigneter Weise mittels im Stand der Technik bekannter Computerprogramme bestimmt werden, wie z.B. dem in dem GCG-Programmpaket bereitgestellten GAP (Programm Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S. B. und Wunsch, C. D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443–453). Bei der Verwendung von GAP mit den folgenden Einstellungen für den DNA-Sequenzvergleich: GAP-Creation-Penalty von 5,0 und GAP-Extension-Penalty von 0,3, zeigen die interessierenden homologen DNA-Sequenzen einen vorzugsweise wie oben beschriebenen Grad der Identität.

[0036] Der Ausdruck „Rekombinierte DNA-Sequenz“ bezeichnet die DNA-Sequenz, die ein Ergebnis eines Rekombinationsereignisses zwischen wenigstens zwei DNA-Sequenzen ist. Das Rekombinationsereignis kann ein einzelnes Rekombinationsereignis sein oder kann zuerst ein Rekombinationsereignis zwischen we-

nigstens zwei DNA-Sequenzen, gefolgt von einem Auskreuzen an einer anderen Stelle als das erste Rekombinationsereignis sein.

[0037] Der Ausdruck „DNA-Struktur“ bezeichnet ein DNA-Molekül, z.B. einen Vektor, ein Plasmid, ein Chromosom (z.B. ein Bacillus-subtilis-Chromosom), ein Virus, einen Phagen, ein Transposon oder ein Genom.

[0038] Der Ausdruck „Vektor“ bezeichnet ein beliebiges lineares oder zirkuläres DNA-Molekül, das fähig ist, eine DNA-Sequenz, die rekombiniert werden soll, und einen Replikationsursprung zu enthalten. Der Ausdruck schließt einen beliebigen, dem Fachmann bekannten Vektor, z.B. ein Plasmid oder einen Phagen, ein. Die DNA-Sequenz befindet sich wahlweise, aber nicht notwendigerweise, unter der Kontrolle eines Promotors.

[0039] Der Ausdruck „eine Zelle“, der hierin im Zusammenhang mit einem erfindungsgemäßen In-Vivo-Rekombinationsverfahren verwendet wird, soll sowohl „eine Zelle“ als auch „eine Zellpopulation“ umfassen.

[0040] Der Ausdruck „Einführen“ bedeutet, dass die DNA-Struktur in eine Zelle eingeführt wird. Die DNA-Struktur kann unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Techniken für die direkte Einführung von DNA, z.B. mittels Elektroporation, Transformation kompetenter Zellen, Protoplastentransformation, Transfektion, Transduktion, Konjugation oder ballistischer Transformation, eingeführt werden.

[0041] Der Ausdruck „Inkubieren“ (oder Kultivieren, Wachsenlassen) bedeutet, dass die Zelle in einer Weise behandelt wird, so dass die normalen Zellfunktionen aktiv sind, speziell die für die Rekombination notwendigen Funktionen. Die Zelle kann auf einem festen Substrat inkubiert werden (Agar-Petrischale), oder die Zelle kann unter Submersbedingungen inkubiert werden. Es ist bevorzugt, dass die Zelle in einem Teströhrchen, z.B. einem Eppendorf-Teströhrchen, inkubiert wird. Im Falle eines temperaturempfindlichen Replikationsursprungs wird das Teströhrchen zweckmäßiger Weise in einen automatischen Thermozykler gestellt. Außerdem kann die Zelle in Standard-Schüttelflaschen inkubiert werden.

[0042] Der Ausdruck „Replikationsursprung“ (ori) bezeichnet eine Region, in der die Replikation einer DNA-Struktur initiiert wird. Der Ausdruck funktionell im Zusammenhang mit Replikationsursprung bedeutet, dass die Replikation an dem Ursprung initiiert werden kann. Der Ausdruck nicht-funktionell bedeutet, dass keine Replikation unter den gegebenen Bedingungen initiiert wird oder dass die Initiation der Replikation verringert ist, z.B. auf ein Niveau, das für das Überleben einer Zelle, die eine DNA-Struktur mit einem Markergen und dem Ori enthält, unter angemessenem Selektionsdruck nicht ausreicht.

[0043] Der Ausdruck „temperaturempfindlich“ bezeichnet im Zusammenhang mit einem Replikationsursprung oder Vektor, dass der Vektor nicht fähig ist, unter z.B. erhöhten Temperaturen, d.h. nicht-permissiven Bedingungen, die dennoch ein Wachstum der Elternzelle erlauben, zu replizieren.

[0044] Der Ausdruck „temperaturresistent“ im Zusammenhang mit Replikationsursprung oder Vektor bedeutet, dass der Vektor fähig ist, bei erhöhten Temperaturen zu replizieren.

[0045] Der Ausdruck „DNA-Bibliothek“ ist eine Bibliothek, die zahlreiche verschiedene DNA-Sequenzen umfasst. Eine DNA-Bibliothek kann gemäß im Stand der Technik bekannter Standardverfahren hergestellt werden, wie z.B. durch In-vitro-DNA-Mischen/DNA-Rekombination (WO 95/17413, WO 95/22625) und/oder fehleranfällige PCR und Kassettenmutagenese.

[0046] Eine DNA-Bibliothek kann erfindungsgemäß so wenige wie 2–20 verschiedene Sequenzen umfassen, wie z.B. eine Bibliothek, in der nur eine Aminosäure variiert ist. Außerdem kann eine DNA-Bibliothek zahlreiche verschiedene DNA-Sequenzen, z.B. bis zu 10^{10} verschiedene Sequenzen, umfassen.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0047] Die vorliegende Erfindung umfasst ein Verfahren zur In-Vivo-Rekombination homologer DNA-Sequenzen, umfassend die Schritte:

- a) Inkubieren einer Zelle, die wenigstens zwei DNA-Strukturen enthält, die jede eine DNA-Sequenz und einen Replikationsursprung umfassen, unter Bedingungen, wobei i) wenigstens ein Replikationsursprung nicht-funktionell ist und ii) die Zelle unter einem Selektionsdruck steht, der ein Wachstum der Zelle nur erlaubt, falls sie die DNA-Struktur mit dem nicht-funktionellen Ursprung enthält (d.h. wodurch eine Integration einer der DNA-Strukturen in eine der anderen und dadurch die Bildung einer hybriden DNA-Struktur begünstigt wird);

b) Verändern der Bedingungen zu Bedingungen, unter denen weniger Replikationsursprünge nicht-funktionell sind als in Schritt a) (d.h. wodurch ein Auskreuzen aus der hybriden DNA-Struktur begünstigt wird); und c) wenigstens einmaliges Wiederholen der Schritte a)–b).

[0048] Die rekombinierte DNA-Sequenz wird neue Polypeptide kodieren, die neue Eigenschaften haben. Es ist dann möglich, in das erfindungsgemäße Verfahren ein Selektions- oder Screeningsystem einzufügen, um gewünschte Eigenschaften, die von oder mehreren der rekombinierten DNA-Sequenz(en) kodiert sind, zu selektieren und/oder darauf zu screenen.

[0049] Die Anzahl der Wiederholung(en) in Schritt (c) oben kann eine Wiederholung sein, oder sie kann mehr sein, wie z.B. 5–10 Wiederholungen oder 50–100 oder sogar eine noch höhere Anzahl von Wiederholungen.

[0050] Es ist bevorzugt, dass die Integration durch Inkubation der Zelle unter Bedingungen, bei denen der Replikationsursprung einer DNA-Struktur nicht-funktionell ist, erzwungen wird (oder für das Überleben der DNA-Struktur vorteilhaft gemacht wird), und dass das Auskreuzen durch Inkubation der Zelle unter Bedingungen, bei denen der Replikationsursprung einer DNA-Struktur wieder funktionell ist, erzwungen wird.

[0051] In einem anderen bevorzugten Ausführungsbeispiel des oben in den Schritten (a) bis (c) dargestellten Ablaufs ist es bevorzugt, dass die Zellen unter konstanten Bedingungen gehalten werden (z.B. konstante Temperatur und Selektionsdruck); bei denen sich ein spontanes Einkreuzen und Auskreuzen ereignet. Das heißt, das Mischungsverfahren in den Zellen wird wiederholt, ohne die Bedingungen wiederholt zu ändern.

[0052] In einer Anzahl von DNA-Strukturen, wie z.B. in vielen Bacillus-DNA-Strukturen (Vektoren) (*Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria, Sonensheim et al., 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.), umfasst der Replikationsursprung einen Ori(+) und einen Ori(-). Der Ori(+) steuert, wo die Replikation des ersten DNA-Strangs beginnt, und der Ori(-) steuert den Initiationspunkt für die Replikation auf dem zweiten Strang (*Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria, Sonensheim et al., 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.).

[0053] In einem Ausführungsbeispiel des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst wenigstens eine DNA-Struktur nicht Ori(-) (d.h. sie umfasst nur Ori(+)). Vorzugsweise ist die DNA-Struktur, die Ori(-) nicht umfasst, eine DNA-Struktur, deren Ursprung (d.h. hierin Ori(+)) während der erfindungsgemäß durchgeführten Bildung der hybriden DNA-Struktur funktionell ist.

[0054] Ein Vorteil dieses erfindungsgemäßen Ausführungsbeispiels ist, dass, wenn nur Ori(+) in der besagten DNA-Struktur funktionell ist, diese DNA-Struktur für eine vergleichsweise längere Dauer in einem einzelsträngigen Zustand ist als im Vergleich eine DNA-Struktur, die sowohl Ori(+) als auch Ori(-) umfasst. Dieser verlängerte einzelsträngige Zustand erleichtert die Bildung der hybriden DNA-Struktur gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren.

[0055] Vorzugsweise ist die DNA-Struktur, die wie oben beschrieben Ori(-) nicht umfasst, eine Bacillus-Struktur, mehr bevorzugt ein Bacillus-Vektor.

[0056] Um dieses Konzept zu veranschaulichen, ist ein Beispiel ein modifizierter pTR- (TR: temperaturresistent) Bacillus-Vektor, der Ori(-) nicht umfasst (siehe [Fig. 1](#)). Falls die Hybridbildung bei 50°C durchgeführt wird, ist nur der Ursprung von pTR funktionell (der Ursprung von pTS (TS: temperatursensitiv) ist nicht funktionell) (siehe [Fig. 1](#), [Fig. 2](#)). Die DNA-Struktur pTR umfasst nur Ori(+) und ist deshalb für eine vergleichsweise längere Dauer in einem einzelsträngigen Zustand, was das Rekombinationsereignis und folglich die Hybridbildung mit der pTS-DNA-Struktur erleichtert (siehe [Fig. 1](#), [Fig. 2](#)).

[0057] Es ist mehr bevorzugt, dass eine DNA-Struktur ein Vektor ist, der fähig ist, unter bestimmten (permissiven) Bedingungen zu replizieren und nicht fähig ist, unter anderen (nicht-permissiven) Bedingungen zu replizieren. Der Vektor kann zum Beispiel einer sein, der bezüglich der Replikation temperaturempfindlich ist. Somit kann der Vektor einer sein, der nicht fähig ist, bei erhöhten Temperaturen zu replizieren, die noch ein Wachstum der Elternzelle erlauben. Die Zelle wird anfänglich bei einer Temperatur inkubiert, die die Vektorreplikation erlaubt, und wird nachfolgend, nachdem die Integration in die andere DNA-Struktur stattgefunden haben mag, bei einer Temperatur inkubiert, die die Vektorreplikation nicht erlaubt, sodass der Vektor aus den Zellen verloren geht, sofern er nicht integriert wurde.

[0058] Der Vektor kann außerdem einen selektierbaren Marker umfassen. In diesem Fall kann die Inkubation

bei der nicht-permissiven Temperatur unter selektiven Bedingungen durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass nur Zellen, die den integrierten Vektor (der die DNA-Sequenz und den selektierbaren Marker einschließt) enthalten, überleben werden.

[0059] Außerdem ist es bevorzugt, ein System zu konstruieren, in dem es möglich ist, die Bildung der Hybridstruktur *in vivo* zu messen.

[0060] Vorzugsweise wird dies durchgeführt, indem ein System konstruiert wird, worin ein *in-vivo*-screenbares oder -selektierbares Protein nur exprimiert wird, nachdem die Hybridstruktur gebildet wurde.

[0061] Vorzugsweise ist das screenbare Protein ein Protein, das unter geeigneter Exponierung fluoreszierend ist, und insbesondere ist das fluoreszierende Protein das Grünfluoreszierende Protein (GFP) oder Varianten davon.

[0062] Das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) oder Varianten davon, und wie GFPs aktiviert werden, um zu fluoreszieren, sind im Stand der Technik beschrieben, und es wird wegen weiterer Einzelheiten auf (Crameri et al., *Nature Biotechnology* 14: 315–319 (1996); und Cromack et al., *GENE* 173: 33–38 (1996)) verwiesen.

[0063] Einer der Vorteile der Verwendung solch eines solchen screenbaren Proteins, das unter geeigneter Lichtexponierung fluoreszierend ist, und insbesondere von GFP oder Varianten davon, besteht darin, dass es dann durch z.B. die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierungstechnologie (FACS) möglich ist, selektiv Zellen auszusortieren, die die besagte Hybridstruktur umfassen. Dies kann den Hintergrund an Zellen eliminieren, die die Hybridstruktur nach der Durchführung von Schritt a) gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung nicht umfassen.

[0064] FACS ist eine weithin bekannte Screeningtechnologie und es wird auf (Cormack et al. „FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)“ *GENE* 173: 33–38 (1996)) wegen weiterer Einzelheiten verwiesen.

[0065] Um ein geeignetes System zu veranschaulichen, das die *In-Vivo*-Messung der Bildung der Hybridstruktur ermöglicht, ist ein Beispiel eines geeigneten Systems in [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigt.

[0066] Alternativ zu der wie oben beschriebenen Verwendung eines screenbaren Proteins kann es vorteilhaft sein, einen selektierbaren Marker zu verwenden, wobei der selektierbare Marker nur transkriptionell aktiv ist, wenn die Hybridstruktur gebildet wird.

[0067] Außerdem ist es bevorzugt, dass das Auskreuzen aus der hybriden DNA-Struktur in Schritt b) des ersten Aspekts der Erfindung ein erzwungenes Auskreuzungsereignis ist.

[0068] Das erzwungene Auskreuzen aus der Hybridstruktur kann durchgeführt werden mittels:

- i) Herstellen eines Systems, worin die DNA-Hybridstruktur keinen selektierbaren Marker exprimiert und wenigstens eine der wenigstens zwei DNA-Strukturen in Schritt a) des ersten Aspekts fähig ist, den selektierbaren Marker zu exprimieren;
- ii) Inkubieren der Zelle unter selektierbaren Bedingungen, wodurch ein Auskreuzen der DNA-Hybridstruktur erzwungen wird, da die Zelle nur fähig ist, das Markergen zu exprimieren, nachdem das Auskreuzen der DNA-Hybridstruktur stattgefunden hat.

[0069] Vorzugsweise wird das oben erwähnte selektierbare Markergen auf einer DNA-Struktur exprimiert, in der der Replikationsursprung während einer wie oben beschrieben durchgeführten, erzwungenen Integration der DNA-Strukturen in eine DNA-Hybridstruktur nicht-funktionell ist, und vorzugsweise ist das selektierbare Markergen ein Antibiotika-Resistenzgen. Siehe unten für die weitere Beschreibung geeigneter selektierbarer Markergene.

[0070] Um das Konzept des erzwungenen Auskreuzens aus der hybriden DNA-Struktur zu veranschaulichen, ist ein Beispiel eines geeigneten Systems in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigt.

[0071] Der selektierbare Marker kann ein beliebiger im Stand der Technik bekannter Marker sein, zum Beispiel ein Gen, das für ein Produkt kodiert, das der Zelle eine Antibiotika-Resistenz verleiht, das einem auxotrophen Stamm Prototrophie verleiht oder das einen Defekt des Wirts komplementiert (z.B. in einen *dal*⁻-Stamm eingeführte *dal*-Gene; vgl. B. Diderichsen (1986), *Bacillus: Molecular Genetics and Biotechnology Applications*, A. T. Ganesan und J. A. Hoch, Hrsg., Academic Press, Seiten 35–46). Der selektierbare Marker kann z.B.

aus einer bekannten Quelle ausgeschnitten oder auf einem Vektor vorhanden sein, z.B. einem Plasmid, das für die Konstruktion der DNA-Struktur verwendet wird, die in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden soll.

[0072] Diese Selektion kann durch Wachsenlassen der Zellen unter Selektionsdruck für den von dem Markergen kodierten Selektionsmarker durchgeführt werden.

[0073] Die DNA-Struktur (in die der Vektor integriert werden soll) kann ein für einen beliebigen selektierbaren Marker kodierendes Gen enthalten, z.B. von einem beliebigen Typ, wie er oben im Zusammenhang mit dem Marker beschrieben wurde, den der in dem erfindungsgemäßen Verfahren zu verwendende Vektor wahlweise trägt. Somit kann das Markergen eine Antibiotikaresistenz, wie z.B. eine Resistenz gegen Kanamycin, Tetracyclin; Ampicillin, Erythromycin, Chloramphenicol, oder eine Resistenz gegen verschiedene Schwermetalle, wie z.B. Selenat, Antimon oder Arsenat, kodieren.

[0074] In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel ist die in dem Verfahren verwendete Zelle bezüglich des enzymatischen Fehlpaarungs-Reparatursystems gestört oder vorübergehend inaktiviert oder weist eine verringerte Aktivität der Fehlpaarungsreparatur auf. Bei der Synthese von DNA können Fehler vorkommen, und die resultierenden nicht-komplementären Basenpaare werden Fehlpaarungen genannt. Es gibt ein Verfahren zur Korrektur von Fehlern (Fehlpaarungen) in DNA. In *E. coli* werden Fehler sehr schnell und genau von zwei Enzymen (MutS und MutL) entdeckt, die ein drittes Enzym (MutU) in die Lage versetzen, die beiden DNA-Stränge zu entwinden, und ein viertes Enzym (MutH) in die Lage versetzen, die neu synthetisierten Stränge an einer DNA-Sequenz (GATC) zu schneiden, die ihrerseits später methyliert wird. Für eine genauere Erklärung wird auf EP 449923 (Setratech) verwiesen, deren Inhalt hierdurch mittels Verweis aufgenommen wird.

[0075] In einem anderen bevorzugten Ausführungsbeispiel ist die in dem Verfahren verwendete Zelle in den Haupt-Rekombinationsenzymen, wie z.B. AddAB, beeinträchtigt oder behindert. Es wurde gezeigt, dass ein in den AddAB-Genen beeinträchtigter Stamm eine höhere Häufigkeit der homologen Rekombination zeigt. Sowohl die legitime als auch die illegitime Rekombinationshäufigkeit sind erhöht. Jedoch ist speziell die Rekombinationshäufigkeit für die illegitime Rekombination bevorzugt, wenn mit einem Stamm gearbeitet wird, der bezüglich der ATP-abhängigen Nuklease AddAB beeinträchtigt oder behindert ist (Meima, R; Haijema, BJ; Dijkstra, H; Haan, GJ; Venema, G; Bron S (1997) Role of enzymes of homologous recombination in illegitimate plasmid recombination in *Bacillus-subtilis*. JOURNAL OF BACTERIOLOGY Bd. 179, Nr. 4, Seiten 1219–1229).

[0076] In einem anderen bevorzugten Ausführungsbeispiel überexprimiert die in dem Verfahren verwendete Zelle eines der Schlüssel-Rekombinationsenzyme, recA. Das recA-Enzym ist an der homologen Rekombination beteiligt, indem es die Renaturierung von ssDNA fördert, um die Heteroduplex-Moleküle zu bilden, die für das Rekombinationsereignis notwendig sind, und initiiert den Austausch von DNA-Strängen. (PROGRESS IN NUCLEIC ACID RESEARCH AND MOLECULAR BIOLOGY Bd. 56, Seiten 129–223 (1997)). Die recA-Überexpression kann entweder durch klassische Mutagenese des Wirtsstamms oder durch Klonieren eines hoch exprimierten recA-Gens erreicht werden.

[0077] In einem anderen bevorzugten Ausführungsbeispiel wird die in dem Verfahren verwendete Zelle UV-, Röntgenstrahlen oder DNA-schädigenden Wirkstoffen ausgesetzt, um die Rekombinationshäufigkeit zwischen den zwei homologen Genen zu erhöhen, die gemischt werden sollen. Stress, wie z.B. UV-, Röntgenstrahlen oder DNA-schädigende Wirkstoffe, induzieren bekanntlich die Rekombinationsenzyme über die SOS-Antwort und aktivieren an Rekombinationsprozessen beteiligte Enzyme wie recA. (BACILLUS SUBTILIS AND OTHER GRAM-POSITIVE BACTERIA, Seiten 529–537 (1993)).

[0078] In einem anderen bevorzugten Ausführungsbeispiel wird das pTR-basierte Plasmid, das als ein Träger eines der zu mischenden Gene benutzt wird, durch entweder eine Niedrigkopie-Version von pTR oder ein anderes mit *B. subtilis* kompatibles Niedrigkopie-Plasmid, wie z.B. pWVO1 (MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, Bd. 249, Nr. 1, Seiten 43–50 (1995)), pTA1060 (JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 142, Nr. 1, Seiten 315–8 (1980)) oder pAMB1 (JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 157, Nr. 2, Seiten 445–53 (1984)), ersetzt.

[0079] In einem weiteren bevorzugten Ausführungsbeispiel ist das eine DNA-Konstrukt, das eines der zu mischenden Gene umfasst, auf dem Chromosom der Zelle angeordnet und ein anderes DNA-Konstrukt, das ein anderes zu rekombinierendes Gen von Interesse umfasst, ist ein Plasmid. Bei der Durchführung eines erfindungsgemäßen In-Vivo-Rekombinationsverfahrens wird das Plasmid mit dem DNA-Konstrukt auf dem Chromosom rekombiniert. Das Plasmid kann z.B. ein temperaturempfindliches Plasmid sein.

[0080] Die Vorteile der Verwendung eines Niedrigkopie-pTR oder eines Systems, bei dem eines der DNA-Konstrukte wie oben beschrieben auf dem Chromosom lokalisiert ist, sind, dass das hybride DNA-Konstrukt nach der Rekombination der beiden homologen Gene die vorherrschende Form der Gene in der Zelle sein wird. Ein Hochkopie-Hintergrund nicht-rekombinierter pTR-Plasmide wird unausweichlich die in der ersten Runde gebildeten Genhybride nach der zweiten Rekombinationsrunde zurück zum Wildtyp revertieren und deshalb jegliches Mischen der beiden Gene verhindern. Wenn das Chromosom als ein Träger für eines der Gene verwendet wird, kann kein Wildtyp-Hintergrund koexistieren, wenn das pTS über die homologen Gene integriert hat.

[0081] Es ist bevorzugt, dass die in dem Verfahren verwendete Zelle eine für die Produktion des Produkts der rekombinierten DNA-Sequenz in großem Maßstab geeignete Zelle ist. Es ist bevorzugt, dass die Zelle eine bakterielle Zelle ist, mehr bevorzugt eine Bacillus-Zelle, am meisten bevorzugt eine Bacillus-subtilis-Zelle.

[0082] Die zu rekombinierenden DNA-Sequenzen können aus Organismen, die die Sequenzen enthalten, in einer an sich bekannten Weise isoliert/kloniert werden. Zum Beispiel kann eine geeignete Oligonukleotid-Sonde auf der Basis einer ersten DNA-Sequenz von Interesse hergestellt werden, um eine zweite DNA-Sequenz zu erhalten, die homolog zu der ersten Sequenz ist. Alternativ kann die DNA-Sequenz mittels PCR hergestellt werden, die auf Primern basiert, die aufgrund der Kenntnis konservierter Regionen entworfen wurden.

[0083] In verschiedenen Ausführungsbeispielen des vorliegenden Inhalts wird der Ausdruck „ein Satz homologer DNA-Sequenzen („Satz A“, „Satz B“, „Satz C“ etc.)“ verwendet, z.B. im Zusammenhang mit einem Ausführungsbeispiel der Erfindung, das sich auf ein erfindungsgemäßes Verfahren bezieht, wobei die homologen DNA-Sequenzen aus zwei oder mehr verschiedenen Sätzen homologer DNA-Sequenzen („Satz A“, „Satz B“, „Satz C“ etc.) bestehen und wobei jeder der Sätze homologer Sequenzen („Satz A“, „Satz B“, „Satz C“ etc.) in ein anderes erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt („DNA-Konstrukt A“, „DNA-Konstrukt B“, „DNA-Konstrukt C“ etc.) inseriert wird.

[0084] Dieser Ausdruck wird verwendet, um zu veranschaulichen, dass ein erfindungsgemäßes In-Vivo-Rekombinationsverfahren verwendet werden kann, um zahlreiche „Sätze“ homologer DNA-Sequenzen zu rekombinieren. Jeder einzelne „Satz“ homologer DNA-Sequenz(en) kann jeweils von nur einer bis zu zahlreichen (z.B. ein „Satz“, der eine DNA-Bibliothek umfasst) einzelnen homologen DNA-Sequenz(en) umfassen.

[0085] Jeder der „Sätze“ homologer DNA-Sequenzen („Satz A“, „Satz B“, „Satz C“ etc.) kann dann in ein anderes erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt („DNA-Konstrukt A“, „DNA-Konstrukt B“, „DNA-Konstrukt C“ etc.) inseriert werden. Jedes der verschiedenen DNA-Konstrukte unterscheidet sich vorzugsweise erfindungsgemäß in wichtigen Parametern, wie z.B. einem verschiedenen Replikationsursprung, verschiedenen selektierbaren Markern etc..

[0086] Alle besagten DNA-Konstrukte („DNA-Konstrukt A“, „DNA-Konstrukt B“, „DNA-Konstrukt C“ etc.) können dann erfindungsgemäß in eine Zelle eingeführt werden, und wenn dann ein erfindungsgemäßes Verfahren zur In-Vivo-Rekombination durchgeführt wird, kann jedes einzelne DNA-Konstrukt („DNA-Konstrukt A“, „DNA-Konstrukt B“, „DNA-Konstrukt C“ etc.) erfindungsgemäß zufällig rekombinieren. Nach einigen Wiederholungen eines erfindungsgemäßen Verfahrens wird dies zu einer DNA-Population in der Zellpopulation führen, die zahlreiche verschiedene Kombinationen verschiedener rekombinierter DNA-Sequenzen umfasst, die zufällig zwischen allen in dem Verfahren verwendeten „Sätzen“ homologer DNA-Sequenzen rekombiniert sind.

[0087] Außerdem wird der Ausdruck „ein Satz homologer DNA-Sequenzen („Satz A“, „Satz B“, „Satz C“ etc.)“ hierin verwendet, um einen der Vorteile eines erfindungsgemäßen In-Vivo-Rekombinationsverfahrens zu veranschaulichen, der die Flexibilität des Systems ausmacht, beide Sätze homologer DNA-Sequenzen, die eine, wenige und/oder zahlreiche (z.B. große DNA-Bibliotheken) einzelne homologe DNA-Sequenzen umfassen, zu rekombinieren.

[0088] Demgemäß bezieht sich ein Ausführungsbeispiel der Erfindung auf ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die besagten Sätze homologer DNA-Sequenzen jeweils nur eine DNA-Sequenz (d.h. die Rekombination von zwei oder mehr homologen Sequenzen) enthalten.

[0089] Des Weiteren sind in erfindungsgemäßen Ausführungsbeispielen die zu rekombinierenden homologen DNA-Sequenzen von einer vorgefertigten DNA-Bibliothek abgeleitet und/oder von einzelnen, verschiedenen, vorgefertigten Bibliotheken abgeleitet.

[0090] Von solchen DNA-Bibliotheken abgeleitete homologe DNAs werden in einen erfindungsgemäßen Vektor inseriert (d.h. DNA, die die DNA-Bibliothek repräsentiert, wird in einen Vektor ligiert (insertiert)). Wie hierin beschrieben, umfasst das erfindungsgemäße Verfahren wenigstens zwei DNA-Strukturen (z.B. Vektoren), die sich in einer Weise unterscheiden, die die erzwungene In-Vivo-Rekombination der Vektoren erlaubt.

[0091] Homologe DNA, die DNA-Bibliotheken repräsentiert, kann in nur einen und/oder beide der besagten unterschiedlichen Vektoren inseriert werden.

[0092] D.h., falls zum Beispiel homologe DNA, die eine DNA-Bibliothek repräsentiert, in einen der unterschiedlichen Vektoren inseriert (ligiert) wird und homologe DNA, die eine andere DNA-Bibliothek repräsentiert, in den anderen Vektor inseriert wird, wird dies eine schnelle und effiziente Rekombination zwischen zwei verschiedenen Bibliotheken durch ein erfindungsgemäßes In-Vivo-Rekombinationsverfahren erlauben. Um dieses Konzept zu veranschaulichen, kann DNA, die eine Bibliothek repräsentiert, in einen pTR-Vektor inseriert werden (siehe [Fig. 1](#)), und DNA, die eine andere Bibliothek repräsentiert, kann in einen pTS-Vektor inseriert werden (siehe [Fig. 1](#)). Schon wenige wiederholte In-Vivo-Rekombinationsereignisse, die mittels eines erfindungsgemäßen Verfahrens durchgeführt werden, werden dann eine Zellpopulation ergeben, die eine neue Bibliothek repräsentiert, die eine Kombination der beiden oben erwähnten Bibliotheken ist.

[0093] Somit beziehen sich Ausführungsbeispiele der Erfindung auf ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei wenigstens einer der Sätze homologer DNA-Sequenzen von einer vorgefertigten DNA-Bibliothek abgeleitet ist und wenigstens einer der Sätze homologer DNA-Sequenzen eine DNA-Sequenz ist, die homolog zu der DNA-Bibliothek ist (d.h. was zu einem Verfahren zur In-Vivo-Rekombination DNA-Bibliothek zu einer DNA-Sequenz führt, die homolog zu der DNA-Bibliothek sind); oder ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die Sätze homologer DNA-Sequenzen von derselben vorgefertigten DNA-Bibliothek abgeleitet sind (d.h. was zu einem Verfahren zur In-Vivo-Rekombination der DNA-Bibliothek führt); oder ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die Sätze homologer DNA-Sequenzen von den wenigstens zwei verschiedenen vorgefertigten DNA-Bibliotheken abgeleitet sind (d.h. was zu einem Verfahren zur In-Vivo-Rekombination von wenigstens zwei verschiedenen DNA-Bibliotheken führt).

[0094] Um noch weitere Rekombination zwischen den DNA-Sequenzen zu erhalten, kann es bevorzugt sein, eine Isolierung der DNA-Strukturen nach der ersten Runde der erfindungsgemäß durchgeführten In-Vivo-Rekombination der DNA-Sequenzen durchzuführen. Die isolierten Strukturen werden dann in die Zellen retransformiert, und eine weitere Verfahrensrunde der In-Vivo-Rekombination wird dann durchgeführt.

[0095] Die Vorteile dieses Schritts werden durch das folgende Beispiel veranschaulicht:

Satz A ist ein Vektor A, wobei die DNA-Sequenzen a, b einzeln in den Vektor A eingeführt werden (d.h. die Vektor-A-Population umfasst einen Vektor mit der DNA-Sequenz a und einen Vektor mit der Sequenz b); und Satz B ist ein Vektor B, wobei die DNA-Sequenzen c, d einzeln in den Vektor B eingeführt werden (d.h. die Vektor-B-Population umfasst einen Vektor mit der DNA-Sequenz c und einen Vektor mit der Sequenz d).

[0096] Die Vektoren A und B werden dann in eine Zellpopulation transformiert und erfindungsgemäß in vivo rekombiniert. Dies wird zur Rekombination zwischen den DNA-Sequenzen ac, ad, bc, bd führen. Die Vektoren A und B, die die rekombinierten Sequenzen umfassen, werden isoliert und in die besagte Zellpopulation retransformiert. Die erfindungsgemäße In-Vivo-Rekombination wird dann alle möglichen Rekombination der vier (a, b, c, d) DNA-Sequenzen ergeben, wie z.B. die Rekombination von abc, abcd, etc.

[0097] In noch weiteren Ausführungsbeispielen bezieht sich die Erfindung auf ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei zwei Sätze homologer DNA-Sequenzen („Satz A" und „Satz B") in vivo rekombiniert werden, umfassend die Schritte:

- a) Insertieren einer(/von) Sequenz(en) aus „Satz A" in einen Vektor, der einen temperaturresistenten Replikationsursprung und ein Gen für einen ersten Marker enthält;
- b) Insertieren einer(/von) Sequenz(en) aus „Satz B" in einen Vektor, der einen temperaturempfindlichen Replikationsursprung und ein Gen für einen zweiten Marker enthält;
- c) Einführen der Vektoren in eine Zelle;
- d) Inkubieren der Zelle bei einer Temperatur, bei der beide Replikationsursprünge funktionell sind, wahlweise unter einem Selektionsdruck, der Zellen mit beiden Markergenen begünstigt;
- e) Verändern der Temperatur zu einer Temperatur, bei der nur der temperaturresistente Replikationsursprung funktionell ist;
- f) wenigstens einmaliges Wiederholen der Schritte d)–e);

oder

ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei zwei Sätze homologer DNA-Sequenzen („Satz A" und „Satz B") in vivo rekombiniert werden, umfassend die Schritte:

- a) Insertieren einer(/von) Sequenz(en) aus „Satz A" in einen Vektor, der einen temperaturresistenten Replikationsursprung und ein Gen für einen ersten Marker enthält;
- b) Insertieren einer(/von) Sequenz(en) aus „Satz B" in einen Vektor, der einen temperaturempfindlichen Replikationsursprung und ein Gen für einen zweiten Marker enthält;
- c) Einführen der Vektoren in eine Zelle;
- d) Inkubieren der Zelle bei einer Temperatur, bei der nur der temperaturresistente Replikationsursprung funktionell ist, wahlweise unter einem Selektionsdruck, der Zellen mit beiden Markergenen begünstigt;
- e) wahlweise Verändern der Temperatur zu einer Temperatur, bei der beide Replikationsursprünge funktionell sind;
- f) wenigstens einmaliges Wiederholen der Schritte d)–e).

[0098] Ein weiterer Aspekt der Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines oder mehrerer rekombinanten/r Proteins/Proteine mit einer gewünschten biologischen Aktivität, umfassend:

- a) Durchführen eines Verfahrens zur In-Vivo-Rekombination homologer DNA-Sequenzen (das Verfahren wird gemäß der Erfindung wie hierin beschrieben durchgeführt), wobei wenigstens eine (der) DNA-Struktur(en) ein Expressionsvektor ist;
- b) Exprimieren der zahlreichen verschiedenen rekombinanten Polypeptide, die von den zahlreichen verschiedenen rekombinierten DNA-Sequenzen aus Schritt a) kodiert werden; und
- c) Screenen oder Selektieren der zahlreichen verschiedenen rekombinanten Proteine aus Schritt b) in einem geeigneten Screening- oder Selektionssystem für ein oder mehrere rekombinantes(e) Polypeptid(e), das/die eine gewünschte Aktivität besitzt/en.

[0099] Vorzugsweise ist der Expressionsvektor in Schritt a) oben eine DNA-Struktur, die während einer erzwungenen Bildung einer hybriden DNA-Struktur (d.h. Integration der Strukturen ineinander), die nach einem erfindungsgemäßen Verfahren zur In-Vivo-Rekombination homologer DNA-Sequenzen durchgeführt wird, nicht fähig ist zu replizieren (z.B. da sie einen nicht-funktionellen Replikationsursprung hat). Dies wird die Wahrscheinlichkeit verbessern, dass der Expressionsvektor nach dem Auskreuzungsereignis der erfindungsgemäßen Hybridstruktur rekombinierte, homologe DNA umfasst, weil die einzige Weise, auf die der Expressionsvektor das Verfahren der erzwungenen Hybridbildung überlebt haben kann, darin besteht, dass er mit einer anderen DNA-Struktur rekombiniert hat, die fähig ist, unter den für das Erzwingen der Hybridstruktur-Bildung verwendeten Bedingungen zu replizieren.

[0100] Nach der Durchführung des Verfahrens zur In-Vivo-Rekombination (Schritt a) oben) und vor den Expressions- und den Screening-Schritten b) und c) oben, kann es vorteilhaft sein, eine Zellpopulation herzustellen, die hauptsächlich nur den Expressionsvektor enthält (d.h. andere(s) DNA-Konstrukt(e) wird/werden zum Teil oder beinahe vollständig aus der Zellpopulation entfernt). Dies ist besonders vorteilhaft, wenn der Expressionsvektor während der wie unmittelbar vorstehend beschriebenen, erzwungenen Bildung der hybriden DNA-Struktur nicht fähig ist zu replizieren, da eine solche Zellpopulation einen sehr begrenzten Hintergrund an nicht-rekombinierten DNA-Sequenzen von Interesse haben wird, was in dem nachfolgenden Screening-Schritt (Schritt c) oben) vorteilhaft ist.

[0101] Das Herstellen einer Zellpopulation, die hauptsächlich nur den Expressionsvektor umfasst, kann gemäß im Stand der Technik bekannter Standardverfahren durchgeführt werden, wie z.B. Wachsenlassen der Zellpopulation unter Bedingungen, die die Replikation des Expressionsvektors im Vergleich zu den anderen DNA-Strukturen selektiv begünstigen; oder selektives Reinigen des Expressionsvektors aus den Zellen und nachfolgendes Einführen von diesem in einen neue Zellpopulation.

[0102] Die Expression der von der rekombinierten Sequenz kodierten rekombinanten Polypeptide in Schritt a) oben kann unter Verwendung eines Standard-Expressionsvektors durchgeführt werden, und/oder ein Standard-Expressionsvektor kann modifiziert werden, um Elemente zu umfassen, die für ein erfindungsgemäßes In-Vivo-Rekombinationsverfahren speziell geeignet sind.

[0103] Ein geeignetes Screening- oder Selektionssystem, um die zahlreichen verschiedenen rekombinanten Proteine aus Schritt b) oben zu screenen oder selektieren, wird von der gewünschten biologischen Aktivität abhängen.

[0104] Eine Anzahl geeigneter Screening- oder Selektionssysteme für das Screenen oder Selektieren auf

eine gewünschte biologische Aktivität ist im Stand der Technik beschrieben. Beispiele sind: Strauberg et al. (Biotechnology 13: 669–673 (1995)), die ein Screeningsystem für das Screenen von Subtilisin-Varianten, die eine Kalzium-unabhängige Stabilität aufweisen, beschreiben; Bryan et al. (Proteins 1: 326–334 (1986)), die einen Screening-Test für das Screenen auf Protease, die eine verbesserte Hitzestabilität hat, beschreiben; und PCT-DK96/00322, die einen Screening-Test für das Screenen auf Lipasen beschreibt, die eine verbesserte Waschleistung in Waschmitteln haben.

[0105] Ein bevorzugtes Ausführungsbeispiel der Erfindung umfasst das Screenen oder die Selektion von rekombinantem/n Protein(en), wobei die gewünschte biologische Aktivität eine verbesserte Leistung in Geschirrspülmitteln oder Waschmitteln für Wäsche ist. Beispiele geeigneter Geschirrspülmittel oder Waschmittel für Wäsche sind in PCT/DK96/00322 und WO 95/30011 offenbart.

[0106] Die Erfindung umfasst auch einen Satz (wenigstens zwei) Vektoren, die wenigstens zwei verschiedene Replikationsursprünge umfassen, die fähig sind, in derselben Zelle unter permissiven Bedingungen zu funktionieren, und wenigstens zwei homologe DNA-Sequenzen, die Polypeptide kodieren. In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel ist wenigstens ein Replikationsursprung temperaturempfindlich. Der Vektor kann vorzugsweise ein Plasmid sein.

[0107] Die Erfindung umfasst außerdem ein Vektorsystem, das wenigstens

- a) einen Vektor A, der eine DNA-Sequenz, die ein Polypeptid kodiert, und einen Replikationsursprung enthält, und
- b) einen Vektor B, der eine DNA-Sequenz, die homolog zu der DNA-Sequenz in Vektor A ist, und einen Replikationsursprung, der sich von dem Replikationsursprung in Vektor A unterscheidet, enthält,

umfasst.

[0108] Die Vektoren können vorzugsweise Plasmide sein.

[0109] Es ist bevorzugt, dass die DNA-Sequenz Polypeptide mit einer biologischen Aktivität kodiert, speziell Enzyme und insbesondere Enzyme, wie z.B. eine Amylase, Lipase, Cutinase, Cellulase, Oxidase, Phytase und eine Protease.

[0110] Die Erfindung umfasst außerdem eine neue rekombinierte DNA-Sequenz, dadurch gekennzeichnet, dass sie durch ein erfindungsgemäßes Verfahren hergestellt wurde oder ein rekombinantes Protein kodiert, das eine gewünschte biologische Aktivität aufweist, wobei das rekombinante Protein, das eine gewünschte biologische Aktivität aufweist, durch das Verfahren gemäß dem Verfahren zur Herstellung eines oder mehrerer rekombinanten/r Proteins/e, die eine erfindungsgemäße gewünschte biologische Aktivität aufweisen, hergestellt ist.

[0111] Die Erfindung umfasst außerdem ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, speziell eines Enzyms, umfassend i) Wachsenlassen einer Zelle, die ein Polypeptid exprimiert, das von einer rekombinierten DNA-Sequenz nach Anspruch 38 kodiert ist, und ii) Reinigen des exprimierten Polypeptids.

[0112] Die Erfindung umfasst außerdem ein neues Polypeptid, speziell ein Enzym, dadurch gekennzeichnet, dass es durch ein erfindungsgemäßes Verfahren hergestellt ist.

[0113] Die Erfindung umfasst außerdem ein Polypeptid, speziell ein Enzym, dadurch gekennzeichnet, dass es von einer erfindungsgemäßen rekombinierten DNA-Sequenz kodiert ist.

[0114] Erfindungsgemäße Polypeptide schließen Peptide und Proteine und wahlweise glycosylierte Formen davon ein. Beispiele sind Enzyme, pharmazeutisch aktive Polypeptide, wie z.B. Analoga von humanen oder von Säugerpolypeptiden, z.B. Insulin, Wachstumshormon, menschliche Hormone oder Wachstumsregulatoren.

[0115] Die Erfindung ist in den folgenden Beispielen, die in keiner Weise den Umfang der Erfindung begrenzen sollen, mit weiteren Einzelheiten beschrieben.

Beispiele

Materialien und Methoden

Stämme

[0116] E. coli: SJ2 (Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sjøholm, C. (1990) Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from Bacillus brevis. J. Bacteriol., 172, 4315–4321). Elektrokompente Zellen, hergestellt und transformiert unter Verwendung eines Bio-Rad GenePulsers™, wie von dem Hersteller empfohlen.

[0117] B. subtilis DN1885 (Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sjøholm, C. (1990) Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from Bacillus brevis. J. Bacteriol., 172, 4315–4321). Kompetente Zellen wurden wie von Yasbin, R. E., Wilson, G. A. und Young, F. E. (1975) Transformation and transfection in lysogenic strains of Bacillus subtilis: evidence for selective induction of prophage in competent cells. J. Bacteriol., 121: 296–304, beschrieben hergestellt und transformiert.

[0118] B. subtilis PL1801. Dieser Stamm ist B. subtilis DN1885 mit disruptierten apr- und npr-Genen (Diderichsen, B., Wedsted, U., Hedegaard, L., Jensen, B. R., Sjøholm, C. (1990) Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from Bacillus brevis. J. Bacteriol., 172, 4315–4321).

Plasmide

[0119] pSX120: B. subtilis-Expressionsvektor (beschrieben in EP 405901 und WO 91100345). Dieser Vektor umfasst das Wildtyp-Savinasegen.

[0120] pE194: (Horinouchi, S. und Weisblum, B., 1982, J. Bacteriol. 150: 804–814).

[0121] pSX222: B. subtilis-Expressionsvektor (beschrieben in WO 96/34946 und WO 92/19729). Dieser Vektor umfasst das synthetische Savinasegen, das hierin Savisyng genannt wird. In das Savisyng ist eine große Anzahl von Restriktionsstellen im Vergleich zu dem in pSX120 enthaltenen Wildtyp-Savinasegen eingeführt.

[0122] pUC19: Yanisch-Perron, C., Viera, J., und Messing, J. (1985) Gene 33, 103–119.

[0123] pF64L-S65T-GFP: ist das E. coli-Plasmid, das das DNA-Fragment kodiert, das das in WO 97111094 beschriebene F64L-S65T-GFP kodiert.

[0124] pMUTIN-4-MCS: Das Plasmid kann von dem Laboratoire de Genetique Microbienne, Institut National de la Recherche Agronomique, 78352 Jouy en Josas – CEDEX, Frankreich, erhalten werden.

Lösungen/Medien

[0125] TY- und LB-Agar (wie beschrieben in Ausubel, F. M. et al. (Hrsg.) „Current protocols in Molecular Biology“. John Wiley and Sons, 1995).

[0126] LBPG ist LB-Agar, der mit 0,5% Glucose und 0,05 M Kaliumphosphat, pH 7,0, supplementiert ist.

[0127] LBPGSK-Platten sind LBPG-Medium mit Agar und 1% Magermilch.

[0128] Antibiotika werden in verschiedenen Medien in Konzentrationen von 6 µg/ml Chloramphenicol, 10 µg/ml Kanamycin und 5 µg/ml Erythromycin verwendet.

[0129] TE-Puffer (wie beschrieben in Ausubel, F. M. et al. (Hrsg.) „Current protocols in Molecular Biology“. John Wiley and Sons, 1995).

Allgemeine molekularbiologische Verfahren

[0130] DNA-Manipulationen und -Transformationen wurden unter Verwendung von Standardverfahren der Molekularbiologie durchgeführt (Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. et al. (Hrsg.) "Current protocols in Molecular Biology".

John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R., und Cutting, S. M. (Hrsg.) "Molecular Biological Methods for Bacillus". John Wiley and Sons, 1990).

[0131] Enzyme für DNA-Manipulationen wurden gemäß den Angaben der Lieferanten verwendet.

Enzyme für DNA-Manipulationen

[0132] Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Enzyme für DNA-Manipulationen, wie z.B. Restriktionsendonukleasen, Ligasen, Polymerasen, PCR-Polymerasen etc., von New England Biolabs, Inc., erhalten.

Konstruktion des temperaturempfindlichen Mischungs-Plasmids

[0133] pMB430 wurde in einem Klonierungsverfahren mit fünf Schritten, wie im Folgenden dargestellt, konstruiert, die gesamte DNA-Sequenz befindet sich in SEQ ID Nr. 1.

[0134] 1) Das temperaturempfindliche Plasmid pE194 wurde durch Einführen multipler Klonierungsstellen rund um die einzige ClaI-Stelle des Plasmids pE194 und somit Zerstören der ClaI-Stelle modifiziert. Dieses Einführen wurde mittels PCR unter Verwendung der Primer #22899 und #24039 zur Amplifizierung des gesamten Plasmids und Einführen mehrerer nur einmal vorkommender Klonierungsstellen durchgeführt.

[0135] Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

1 µl einer pE194-Qiaquick-Plasmidpräparation wurde für eine 50-µl-PCR-Amplifikation in PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% (Gew/Vol) Gelatine) verwendet, der 200 µM jedes dNTPs, 2,5 Units AmpliTaq-Polymexase (Perkin-Elmer, Cetus, USA) und 100 pmol jedes Primers enthielt:

#22899

5' -GCAGCTGGATCCGCGGCCGCGAATTCGTCTTTTGCGCAGTCGGC-3'

#24039

5' -GCAGCTGGATCCGGGCCCGGAAGCTTCGATTCACAAAAAATAGGCACACG-3'

[0136] Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung eines DNA-Thermostycklers (Landgraf, Deutschland) durchgeführt. Eine Inkubation bei 94°C für 1 min, gefolgt von vierzig PCR-Zyklen, die durchgeführt wurden, indem ein Zyklusprofil von Denaturierung von 94°C für 1 min, Annealing bei 55°C für 1 min und Verlängerung bei 72°C für 2 min durchgeführt wurden. Fünf-µl-Aliquots des Amplifikationsprodukts wurden durch Elektrophorese in 0,7%-Agarosegelen (NuSieve, FMC) analysiert.

Subklonierung von PCR-Fragment

[0137] Fünfundvierzig-µl-Aliquots der wie oben beschrieben hergestellten PCR-Produkte wurden unter Verwendung des QIAquick-PCR-Purification-Kits (Qiagen, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Die gereinigte DNA wurde in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert. Fünfzig µl des gereinigten PCR Fragments wurden mit BamHI gespalten, in Gelen mit 0,8% Agarose mit niedriger Gelierungstemperatur (SeaPlaque GTG, FMC) elektrophoretisiert, das betreffende Fragment wurde aus den Gelen ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick-Gel-Extraction-Kits (Qiagen, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Das isolierte DNA-Fragment wurde dann an mit BamHI-gespaltenen pUC19 ligiert, und das Ligationsgemisch wurde verwendet, um E. coli SJ2 zu transformieren.

[0138] Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten plattiert, die Erythromycin (200 µg/ml), enthielten und mit X-gal (SIGMA, USA) (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-alpha-D-galactopyranosid, 50 µg/ml) supplementiert waren.

Identifizierung und Charakterisierung positiver Klone

[0139] Die transformierten Zellen wurden auf Erythromycin (200 µg/ml) enthaltende, mit X-gal (50 µg/ml) supplementierte LB-Agarplatten plattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Weiße Kolonien wurden am nächsten Tag durch Ausstreichen auf frische LB-Erythromycin-Agarplatten gerettet und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Einzelkolonien des nächsten Tages jedes Klons wurden in flüssiges LB-Medium transferiert, das Erythromycin (200 µg/ml) enthielt, und über Nacht bei 37°C unter Schütteln bei 250 upm inkubiert.

[0140] Plasmide wurden aus den Flüssigkulturen unter Verwendung des QIAgen-Plasmid-Purification-Mini-Kits (Qiagen, USA) nach den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Fünf- μ l-Proben der Plasmide wurden mit BamHI gespalten. Die Spaltungen wurden durch Gelelektrophorese auf einem 0,7%-Agarosegel (NuSieve, FMC) überprüft. Das Erscheinen von zwei DNA-Fragmenten von in etwa 2,7 kb und 3,7 zeigte einen positiven Klon an. Der Klon wurde MB293 genannt und das Plasmid pMB293.

[0141] 2) pMB293 wurde dann mit EcoRI gespalten und das 3,8-kb-Fragment wurde auf einem 0,7--Agarosegel und unter Verwendung des QiaQuick-Gelpurification-Kits von Qiagen gemäß dem Hersteller Gel-gereinigt. Dieses Fragment, das pE194 mit insertierten multiplen Klonierungsstellen (die von den PCR-Primern und von der MCS von pUC19 stammen) darstellt, wurde durch Ligation zirkularisiert und verwendet, um *B. subtilis* DN1885 zu transformieren, transformierte Zellen wurden auf LBPG-Platten, die 5 μ g/ml Erythromycin enthielten, selektiert, und die Inkubation wurde bei 33°C über Nacht durchgeführt. Klone aus dieser Transformation wurden erneut ausgestrichen und über Nacht in TY mit 5 μ g/ml Erythromycin kultiviert. Aus der Brühe der Übernachtskultur wurden Zellen isoliert, und Plasmide wurden unter Verwendung des Qiaquick-Plasmid-Kits gereinigt. Die Restriktionsenzym-Spaltung der Plasmide bestätigte die Korrektheit der Klone. Ein solcher/s Klon und Plasmid wurde MB333 und pMB333 genannt.

[0142] 3) pMB333 wurde dann als das temperaturempfindliche Plasmid für die Konstruktion eines Plasmids verwendet, das das Savizyngens ohne irgendeinen Promotor enthielt. Dieses Konstrukt wurde wie folgt hergestellt.

[0143] Eine PCR unter Verwendung der Primer #21547 und #21548 und von pSX222 als Vorlage wurde gemäß diesen Bedingungen durchgeführt:

1 μ l pSX222-Qiaquick-Plasmidpräparation wurde für eine 50 μ l-PCR-Amplifizierung in PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% (Gew/Vol) Gelatine) verwendet, der 200 μ M jedes dNTPs, 2,5 Units AmpliTaq-Polymerase (Perkin-Elmer, Cetus, USA) und 100 pmol jedes Primers enthielt:

#21547

5' -GCAGCTGCAGGATCCGAATTCGCGGCCGCGCAATCGGTACCATGG-3'

#21548

5' -GCAGCGAGCTCAAGCTTCCCGGGCCAGCCGGTTCGACCGCGTTGCCGCTTCTGCG-3'

[0144] Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung eines DNA-Thermostycklers (Landgraf, Deutschland) durchgeführt. Eine Inkubation bei 94°C für 1 min, gefolgt von vierzig PCR-Zyklen, die unter Verwendung eines Zyklusprofils von Denaturierung bei 94°C für 1 min, Annealing bei 55°C für 1 min und Verlängerung bei 72°C für 2 min, durchgeführt wurden. Fünf- μ l-Aliquots des Amplifikationsproduktes wurden durch Elektrophorese in 0,7%-Agarosegelen (NuSieve, FMC) analysiert.

Subklonierung von PCR-Fragment

[0145] Fünfundvierzig- μ l-Aliquots des wie oben beschrieben hergestellten PCR-Produktes wurden unter Verwendung des QIAquick-PCR-Purification-Kits (Qiagen, USA) nach den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Die gereinigte DNA wurde in 50 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, eluiert. Fünfzig μ l des gereinigten PCR-Fragments wurden mit BamHI und Apal gespalten, in Gelen mit 0,8% Agarose mit niedriger Gelierungstemperatur (SeaPlaque GTG, FMC) elektrophoretisiert, das betreffende Fragment wurde aus den Gelen ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick-Gel-Extraction-Kits (Qiagen, USA) nach den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Gereinigtes Fragment wurde an den Gel-gereinigten, BamHI- und Apal-gespaltenen pMB333 ligiert. Die Ligation wurde verwendet, um *B. subtilis* DN1885 zu transformieren. Transformierte Zellen wurden auf LBPG-Agarplatten plattiert, die 5 μ g/ml Erythromycin enthielten, und über Nacht bei 33°C inkubiert. Klone wurden erneut auf ähnlichen Platten ausgestrichen, und Plasmide wurden aus Übernachtskulturen von Klonen gereinigt, die bei 33°C in TY mit 5 μ g/ml Erythromycin inkubiert waren. Plasmide wurden unter Verwendung des Qiaquick-Plasmid-Kits, wie von dem Hersteller beschrieben, isoliert. Die Plasmide wurden durch enzymatische Spaltung unter Verwendung von Apal und BamHI überprüft. Ein korrekter Klon wurde MB339 genannt und das Plasmid pMB339.

[0146] 4) Wir wollten einen einfachen Weg testen, um zu überwachen, dass sich Hybridplasmide gebildet hatten. Deshalb wollten wir die erzwungene Rekombination zwischen den beiden homologen Genen auf den beiden getrennten Plasmiden überwachen. Dies wurde durchgeführt, indem ein pE194-Derivat konstruiert wurde, das ein promotorloses Savizyngens aufwies, das transkriptionell an einen ORF fusioniert war, der GFP kodierte. Auf

diese Weise sollte es keine Expression von GFP geben (wegen des Fehlens eines Promotors stromaufwärts des Savizyns und damit des GFP-Gens), außer die beiden homologen Gene hatten rekombiniert, wodurch das GFP unter die Kontrolle des sonst auf pSX120 vorhandenen Promotors geriet. Das Plasmid wurde durch PCR-Amplifikation des GFP-Gens und dessen Einfügen unmittelbar stromabwärts des Savizyns auf dem pMB339 konstruiert.

[0147] Die hierin verwendete GFP-kodierende DNA ist ein Derivat des ursprünglichen Wildtyp-Gens, das Derivat von GFP wurde aus dem DNA-Konstrukt der Mutante F64L-S65T-GFP kloniert, die wie in der internationalen Patentanmeldung WO 97/11094 beschrieben konstruiert wurde.

[0148] Die Konstruktion des Vorlage-Plasmids wurde in WO 97/11094 beschrieben. Das für das F64L-S65T-GFP kodierende DNA-Fragment wurde mittels PCR aus dem dieses Gen kodierenden E. coli-Plasmid wie folgt amplifiziert:

1 µl einer Qiaquick-Plasmidpräparation von pF64L-S65T-GFP wurde für eine 50-µl-PCR-Amplifizierung in FCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% (Gew/Vol) Gelatine) verwendet, der 200 µM jedes dNTPs, 2,5 Units AmpliTaq-Polymerase (Perkin-Elmer, Cetus, USA) und 100 pmol jedes Primers enthielt:

#20231

5' - **AACTGCAGAAGATGTTGGACGCGC** - 3'

#101381

5' - **GCCCAATGCATAAACTGCATCCCTTAACTTGTTTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCATG** -
3'

[0149] Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung eines DNA-Thermostycklers (Landgraf, Deutschland) durchgeführt. Eine Inkubation bei 94°C für 1 min, gefolgt von vierzig PCR-Zyklen, die unter Verwendung eines Zyklusprofils von Denaturierung bei 94°C für 1 min, Annealing bei 55°C für 1 min und Verlängerung bei 72°C für 2 min, durchgeführt wurden. Fünf-µl-Aliquots des Amplifikationsproduktes wurden durch Elektrophorese in 0,7%-Agarosegelen (NuSieve, FMC) analysiert.

Subklonieren des PCR-Fragments

[0150] Fünfundvierzig-µl-Aliquots des wie oben beschrieben hergestellten PCR-Produkte wurden unter Verwendung des QIAquick-PCR-Purification-Kits (Qiagen, USA) nach den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Die gereinigte DNA wurde in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert. Das PCR-Fragment und pMB339 wurden mit ClaI und NsiI gespalten, wie oben Gel-gereinigt und miteinander ligiert. Das Ligationsgemisch wurde verwendet, um DN1885 zu transformieren, transformierte Zellen wurden auf LBPG 5 µg/ml Erythromycin plattiert. Nach 18 Stunden der Inkubation wurden grün fluoreszierende Zellen als einzelne Kolonien sichtbar. Eine von diesen wurde analysiert und als MB406, sowie das entsprechende Plasmid als pMB406, gerettet. Da der GFP-kodierende ORF keinen stromaufwärts gelegenen Promotor besaß, der die Transkription antrieb, konnte eine möglich - Erklärung für die GFP-Expression ein Durchlesen von einem weiter stromaufwärts gelegenen Promotor der Savizyn-GFP-Transkriptionsfusion sein, nämlich der Promotor des repF-Gens.

[0151] 5) Um jegliches Durchlesen in den ORF von GFP zu beseitigen, wurde ein Transkriptionsterminator zwischen das repF-Gen und die Savizyn-DNA inseriert. Der Terminator wurde aus dem pMUTIN-4-MCS-Plasmid unter Verwendung der folgenden Primer und Bedingungen amplifiziert:

1 µl einer Qiaquick-Plasmidpräparation von pMUTIN-4-MCS wurde für eine 50-µl-PCR-Amplifizierung in PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% (Gew/Vol) Gelatine) verwendet, der 200 µM jedes dNTPs, 2,5 Units AmpliTaq-Polymerase (Perkin-Elmer, Cetus, USA) und 100 pmol jedes Primers enthielt:

#102588

5' - **CGGACGGTACCGGTAATGACTCTCTAGCTTGAGGC** - 3'

#102589

5' - **GGGTACAGATCTCCGCGGCGCAAAAAGGCCATCCGTCAGG** - 3'

[0152] Die PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung eines DNA-Thermozyklers (Landgraf, Deutschland) durchgeführt. Eine Inkubation bei 94°C für 60 sec gefolgt von vierzig PCR-Zyklen, die unter Verwendung eines Zyklusprofils von Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Annealing bei 55°C für 30 min und Verlängerung bei 72°C für 1 min, durchgeführt wurden. Fünf- μ l-Aliquots des Amplifikationsproduktes wurden durch Elektrophorese in 0,7-%-Agarosegelen (NuSieve, FMC) analysiert.

[0153] Die amplifizierte DNA wurde wie oben gereinigt und als ein KpnI-BglII-Fragment in pMB406 kloniert, der ebenfalls mit BglII und KpnI gespalten war (das gleiche Verfahren bezüglich der Gel-Reinigung etc., wie oben beschrieben). Das Ligationsgemisch wurde verwendet, um DN1885 zu transformieren, transformierte Zellen wurden auf LBPG-5- μ g/ml-Erythromycin plattiert. Nach 18 Stunden der Inkubation wurden Zellen als einzelne Kolonien sichtbar. Eine von diesen wurde analysiert und als MB430, und entsprechend das Plasmid pMB430, gerettet. Dieser Klon wies absolut keine Expression von GFP auf was darauf hindeutete, dass der klonierte Terminator tatsächlich wie erwartet funktionierte.

[0154] Die resultierende Sequenz des gesamten Plasmids pMB430 ist als SEQ Nr. 1 aufgelistet.

Herstellen des Stamms MB432

[0155] *Bacillus subtilis* PL1801 wurde mit den zwei Plasmiden pMB430 und pSX120 transformiert, wobei in etwa 1 μ g jedes Plasmids pro 100 μ l kompetenter PL1801 verwendet wurden. Die transformierten Zellen wurden auf LBPG-5 μ g/ml Erythromycin plattiert, über Nacht bei 33°C inkubiert. Kolonien des nächsten Tages wurde erneut auf LBPG-5 μ g/ml Erythromycin + 6 μ g/ml Chloramphenicol ausgestrichen und über Nacht bei 33°C inkubiert. Klone wurden auch in Flüssigkultur in TY 5 μ g/ml Erythromycin + 6 μ g/ml Chloramphenicol über Nacht bei 33°C wachsen gelassen, Plasmide wurde aus Kulturbrühe gereinigt, und das Vorhandensein von sowohl pMB430 als auch pSX120 in dem PL1801-Stamm wurde verifiziert. Dieser Klon wurde gerettet und MB432 genannt.

Beispiel 1

Sequenzmischen von zwei homologen Sequenzen, die beide für das Subtilisingen der Savinase kodieren

[0156] Das Savinase-wt-Gen (in pSX120 enthalten), das für eine Protease des Subtilisintyps kodiert, wurde als das Ziel für das Mischen hoch homologer Gene ausgewählt. Eine ortsspezifische Variante des Savinasegens (hierin im Folgenden Savizyn genannt, in pSX222 enthalten, worin eine große Zahl stummer Mutationen, die zu neuen Restriktionsstellen führen, eingefügt ist), wurde als der Mischungspartner für die Savinase verwendet. Die beiden Gene wurden erfindungsgemäß auf zwei getrennte, kompatible Plasmide kloniert. Ein transkriptionell aktives Savinasegen wurde in ein auf dem Ursprung von pUB110 basierendes Plasmid kloniert, das für Resistenz gegenüber Chloramphenicol kodiert (pSX120, [Fig. 4](#)). Ein promotorloses Savizyngens wurde in ein Derivat des temperaturempfindlichen Plasmids pE194 kloniert, das auch für eine Resistenz gegen Erythromycin kodiert (pMB430). Zwei Transkriptionsterminatoren wurden stromaufwärts des Savizyngens kloniert, um jegliches Durchlesen zu verhindern.

[0157] In pMB430 war das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) transkriptionell an das Savizyngens fusioniert, um ein visuelles Verfolgen der Einkreuzungs- und Auskreuzungsereignisse zwischen den beiden Plasmiden zu ermöglichen.

[0158] Der *B. subtilis*-Stamm MB432, pL1801, transformiert mit den zwei Plasmiden pSX120 und pMB430, wurde zwei Zyklen von Temperaturverschiebungen unterzogen, um zwei aufeinander folgende Doppel-Crossoverereignisse zwischen den homologen Genen zu induzieren. Auf LBPG-Platten wurde bei der restriktiven Temperatur (47–50°C) in der Gegenwart von Erythromycin auf homologe Rekombination und Plasmid-Hybridbildung selektiert. Unter diesen restriktiven Bedingungen wird das temperaturempfindliche Plasmid pMB430 durch homologe Rekombination in der Savinase/Savizyn-Region in das stabile pSX120-Plasmid gezwungen. Diese Kolonien, in denen die Rekombination stattgefunden hat, werden außerdem als ein Ergebnis der Rekombination zwischen den beiden Plasmiden und der gleichzeitigen Aktivierung des Savizyn-GFP-Operons ([Fig. 2](#)) fluoreszierend. Auf Auskreuzungsereignisse wurde durch Wachsenlassen der Klone in LB-Brühe bei der permissiven Temperatur von 30°C für zwei Tage und Plattieren der Zellen auf LBPG-Platten mit Chloramphenicol und Erythromycin gescreent. Die nicht-fluoreszierenden Kolonien wurden erneut auf Platten ausgestrichen und einer zweiten, wie oben beschriebenen Runde des Temperaturzyklus unterzogen.

[0159] Nach der zweiten Mischungsrunde wurden Plasmidpräparationen aus 20 verschiedenen Klonen her-

gestellt. Kompetenter PL1801 wurde mit jeder der 20 Plasmidpräparationen transformiert und auf mit Erythromycin supplementiertes LBPG plattiert. Die Platten wurden auf LBPG-Platten mit Chloramphenicol und Erythromycin repliziert, um unerwünschte Klone zu identifizieren, in denen sowohl pSX120 als auch pMB430 transformiert worden waren. Klone, in denen nur das pMB430-Plasmid transformiert worden waren, wurden für das Sequenzieren der Savizyn-Region ausgewählt, um zu identifizieren, ob eine Mischung stattgefunden hatte. Es ist aus der [Fig. 6](#) ersichtlich, dass eine Rekombination zwischen den beiden Genen Savinase und Savizyn stattgefunden hatte. Alle 12 sequenzierten Klone zeigten einen gewissen Grad der Rekombination, und 4 von diesen können positiv als das Ergebnis von zwei aufeinander folgenden doppelten Rekombinationsereignissen identifiziert werden. Es ist wichtig zu bemerken, dass ein Austausch der Savinase- und Savizyn-Sequenz nur beobachtet werden kann, falls das gemischte Fragment eine Restriktionsstelle überlappt, die nur in Savizyn vorkommt. Die vier Klone mit einem positiven Hinweis auf zwei doppelte Rekombinationen entsprechen deshalb der Mindestanzahl, da die Rekombination sich zwischen zwei benachbarten Restriktionsstellen ereignet haben könnte.

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 5313 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA

(vi) URSPRUNGSQUELLE:

- (A) ORGANISMUS: Plasmid pMB430

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 1:

GATCAGTACA AGAAAGATAC TGTATTTTCAT AAACAGGAAC TGCAAGAAGT TAAGGATGAG	60
TTACAGAAGG CAAATAAGCA GTTACAGAGT GGAATAGAGC ATATGAGGTC TACGAAACCC	120
TTTGATTATG AAAATGAGCG TACAGGTTTG TTCTCTGGAC GTGAAGAGAC TGGTAGAAAG	180
ATATTAAC TG CTGATGAATT TGAACGCCTG CAAGAAACAA TCTCTTCTGC AGAACGGATT	240
GTTGATGATT ACGAAAATAT TAAGAGCACA GACTATTACA CAGAAAATCA AGAATTAAAA	300
AAACGTAGAG AGAGTTTGAA AGAAGTAGTC AATACATGGA AAGAGGGGTA TCACGAAAAA	360
AGTAAAGAGG TTAATAAATT AAAGCGAGAG AATGATAGTT TGAATGAGCA GTTGAATGTA	420
TCAGAGAAAT TTCAAGCTAG TACAGTGA CT TTATATCGTG CTGCGAGGGC GAATTTCCCT	480
GGGTTTGAGA AAGGGTTTAA TAGGCTTAAA GAGAAATTCT TTAATGATTC CAAATTTGAG	540
CGTGTGGGAC AGTTTATGGA TGTTGTACAG GATAATGTCC AGAAGGTCGA TAGAAAGCGT	600
GAGAAACAGC GTACAGACGA TTTAGAGATG TAGAGGTACT TTTATGCCGA GAAACTTTT	660

TGCGTGTGAC AGTCCTTAAA ATATACTTAG AGCGTAAGCG AAAGTAGTAG CGACAGCTAT	720
TAACITTCGG TTGCAAAGCT CTAGGATTTT TAATGGACGC AGCGCATCAC ACGCAAAAAG	780
GAAATTGGAA TAAATGCCAA ATTTGAGATG TTAATTAAAG ACCTTTTGA GGTCTTTTTT	840
TCTTAGATT TTGGGGTAT TTAGGGGAGA AAACATAGGG GGGTACTACG ACCTCCCCC	900
TAGGTGTCCA TTGTCCATTG TCCAAACAAA TAATAAATA TTGGGTTTTT AATGTTAAAA	960
GGTTCTTTTT TATGTTAAAG TGAAAAAAC AGATGTTGGG AGGTACAGTG ATGTTGTAG	1020
ATAGAAAAGA AGAGAAAAA GTTGCTGTTA CTTAAGACT TACAACAGAA GAAAATGAGA	1080
TATTAATAG AATCAAAGAA AAATATAATA TTAGCAAATC AGATGCAACC GGTATTCTAA	1140
TAAAAAATA TGCAAAGGAG GAATACGGTG CTTTTAAAC AAAAAAGAT AGACAGCACT	1200
GGCATGCTGC CTATCTATGA CTAATTTTG TTAAGTGAT TAGCACCGTT ATTATATCAT	1260
GAGCGAAAT GTAATAAAG AACTGAAAA CAAGAAAAT TCAAGAGGAC GTAATTGGAC	1320
ATTGTTTTA TATCCAGAAT CAGCAAAGC CGAGTGTTA GAGTATTTAA AAGAGTTACA	1380
CATTCAATT GTAGTGTCTC CATTACATGA TAGGGTACT GATACAGAAG GTAGGATGAA	1440
AAAAGAGCAT TATCATATC TAGTGATGTA TGAGGGTAAT AAATCTTATG AACAGATAAA	1500
AATAATTAAC AGAAGAATTG AATGCCACTA TTCCGCAGAT TGCAGGAAGT GTGAAAGGTC	1560
TTGTGAGATA TATGCTTCAC ATGGACGATC CTAATRAATT TAAATATCAA AAAGAAGATA	1620
TGATAGTTTA TGGCGGTGTA GATGTTGATG AATTATTAAA GAAAACAACA ACAGATAGAT	1680
ATAAATTAAT TAAAGAAATG ATTGAGTTTA TTGATGAACA AGGAATCGTA GAATTTAAGA	1740
GTTAATGGA TTATGCAATG AAGTTTAAAT TTGATGATG GTCCCGCTT TTATGTGATA	1800

ACTCGGCGTA	TGTTATTCAA	GAATATATAA	AATCAAATCG	GTATAAATCT	GACCGATAGA	1860
TTTTGAATTT	AGGTGTCACA	AGACACTCTT	TTTTCGCACC	AGCGAAAAC	GGTTTAAGCC	1920
GACTGCGCAA	AAGACGAATT	CGAGCTCGGT	ACCGGTAATG	ACTCTCTAGC	TTGAGGCATC	1980
AAATAAAACG	AAAGGCTCAG	TCGAAAGACT	GGGCCTTTCG	TTTATCTGT	TGTTTGTCCG	2040
TGAACGCTCT	CCTGAGTAGG	ACAAATCCGC	CGCTCTAGCT	AAGCAGAAGG	CCATCCTGAC	2100
GGATGGCCTT	TTTGCGCCGC	GGAGATCTAA	ATATTCTGTT	TGGCGCAAGC	TTTGTACCAG	2160
GGGAACCGTC	GACTCAAGAT	GGGAATGGGC	ATGGCACC	TGTGGCCGGG	ACGATCGCTG	2220
CTTTAAACAA	TTCGATTGGC	GTTCTTGGCG	TAGCGCCGAG	CGCTGAGCTA	TACGCTGTTA	2280
AAGTCCTAGG	GGCGAGCGGT	TCAGGTTCCG	TCAGCTCGAT	TGCCCAAGGA	TTGGAATGGG	2340
CAGGGAACAA	TGGCATGCAC	GTTGCTAATT	TGAGTTTAGG	AAGCCCTTCG	CCAAGTGCCA	2400
CACTCGAGCA	AGCTGTTAAT	AGCGCGACTT	CTAGAGGCGT	TCTGTGTGTA	GCGGCATCTG	2460
GGAATTCAGG	TGCAGGCTCA	ATCAGCTATC	CGGCGCGCTA	TCCGAACGCA	ATGGCAGTCG	2520
GAGCTACTGA	TCAAACAAC	AACCGCGCTA	GCTTTTCACA	GTATGGCGCA	GGCCTTGACA	2580
TTGTGCGACC	CGGGTAAAC	GTGCAGAGCA	CATACCCAGG	TTCAACATAT	GCCAGCTTAA	2640
ACGGTACATC	GATGGCTACT	CCTCATGTTG	CAGGTGCGGC	CGCCCTTGTT	AAACAAAAGA	2700
ACCCATCTTG	GTCTAATGTA	CAAATTCGAA	ATCATCTAAA	GAATACGGCA	ACTAGTTTAG	2760
GAAGCAGGAA	CTTGATGGA	AGCGGACTTG	TTAACGCAGA	AGCGGCAACG	CGTTAAAAAT	2820
GAGGAGGGAA	GCTTTATGAG	TAAAGGAGAA	GAACTTTCA	CTGGAGTTGT	CCCAATTCTT	2880
GTTGAATTAG	ATGGCGATGT	TAATGGGCAA	AAATTCTCTG	TTAGTGGAGA	GCGTGAAGGT	2940

GATGCAACAT ACGGAAACT TACCCTTAAA TTTATTGCA CTA CTGGGAA GCTACCTGTT	3000
CCATGGCCAA CGCTTGTCAC TACTCTCTCT TATGGGTTC AATGCTTTC TAGATACCCA	3060
GATCATATGA AACAGCATGA CTTTTCAAG AGTGCCATGC CCGAAGGTTA TGTACAGGAA	3120
AGA ACTATAT TTTACAAAGA TGACGGGAAC TACAAGACAC GTGCTGAAGT CAAGTTGAA	3180
GGTGATACCC TTGTTAATAG AATCGAGTTA AAAGGTATTG ATTTAAAGA AGATGGAAC	3240
ATTCTTGGAC ACAAATGGA ATACAATTAT AACTCACATA ATGTATACAT CATGGCAGAC	3300
AAACCAAAGA ATGGCATCAA AGTTAACTTC AAAATTAGAC ACAACATTAA AGATGGAAGC	3360
GTTCAATTAG CAGACCATTA TCAACAAAT ACTCCAATTG GCGATGGCCC TGTCCTTTA	3420
CCAGACAACC ATTACCTGTC CACGCAATCT GCCCTTCCA AAGATCCCAA CGAAAAGAGA	3480
GATCACAATGA TCCTTCTTGA GTTTGTAACA GCTGCTGGGA TTACACATGG CATGGATGAA	3540
CTATACAAAT AAAACAAGTT AAGGGATGCA GTTTATGCAT CCCTTAACTT ACTTATTA	3600
TAATTTATAG CTATTGAAA GAGATAAGAA TTGTTCAAAG CTAATATTGT TAAATCGTC	3660
AATCCTGCA TGTTTAAGG AATTGTTAAA TTGATTTTT GTRAAATATT TCTTGATTC	3720
TTTGTTAACC CATTTCATAA CGAAATAATT ATACTTTTGT TTATCTTGT GTGATATTCT	3780
TGATTTTTTT CTA CTTAATC TGATAAGTGA GCTATTCACT TTAGGTTAG GATGAAAATA	3840
TTCTCTGGA ACCATACTTA ATATAGAAAT ATCAACTTCT GCCATTAAAA GTAATGCCAA	3900
TGAGCGTTT GTATTAATA ATCTTTTAGC AAACCCGTAT TCCACGATTA AATAAATCTC	3960
ATTAGCTATA CTATCAAAA CAATTTGCG TATTATATCC GTA CTATGT TATAAGGTAT	4020
ATTACCATAT ATTTATAGG ATGGTTTTT AGGAATTTA AACTGCAATA TATCCTTGT	4080

TAAACTTGG AAATTATCGT GATCAACAAG TTTATTTTCT GTAGTTTTGC ATAATTTATG	4140
GTCTATTTCA ATGGCAGTTA CGAAATTACA CCTCTTTACT AATCAAGGG TAAAATGGCC	4200
TTTCCTGAG CCGATTTCAA AGATATTATC ATGTTCAATT AATCTTATAT TTGTCATTAT	4260
TTTATCTATA TTATGTTTTG AAGTAATAAA GTTTGACTG TGTTTTATAT TTTCTCGTT	4320
CATTATAACC CTCTTTAATT TGGTTATATG AATTTTGCTT ATTAACGATT CATTATAACC	4380
ACTTATTTTT TGTTGGTTG ATAATGAACT GTGCTGATTA CAAAATACT AAAAATGCC	4440
ATATTTTTTC CTCCTTATAA AATTAGTATA ATTATAGCAC GAGCTCTGAT AAATATGAAC	4500
ATGATGAGTG ATCGTTAAAT TTATACTGCA ATCGGATGCG ATTATTGAAT AAAAGATATG	4560
AGAGATTAT CTAATTTCTT TTTCTTGTA AAAAAAGAAA GTTCTTAAAG GTTTTATAGT	4620
TTTGGTCGTA GAGCACACGG TTTAACGACT TAATTACGAA GTAATAAGT CTAGTGTGTT	4680
AGACTTTATG AAATCTATAT ACGTTTATAT ATATTTATTA TCCGGAGGTG TAGCATGTCT	4740
CATTCAATT TGAGGTTGC CAGAGTTAAA GGATCAAGTA ATACAACCG GATACAAAGA	4800
CATAATCAAA GAGAGAATAA AACTATAAT AATAAAGACA TAAATCATGA GGAACATAT	4860
AAAATTATG ATTTGATTAA CGCACAAAAT ATAAAGTATA AAGATAAAT TGATGAAACG	4920
ATTGATGAGA ATTATTCAGG GAAACGTAAA ATTCGGTCAG ATGCAATTCG ACATGTGGAC	4980
GGACTGGTTA CAAGTGATAA AGATTTCTTT GATGATTTAA GCGGAGAAGA AATAGAACGA	5040
TTTTTTAAAG ATAGCTTGGG GTTCTAGAA AATGARTACG GTAAGGAAAA TATGCTGTAT	5100
GCGACTGTCC ATCTGGATGA AAGAGTCCCA CATATGCACT TTGGTTTTGT CCCTTTAACA	5160
GAGGACGGGA GATTGTCTGC AAAAGAACAG TTAGGCAACA AGAAAGACTT TACTCAATTA	5220
CAAGATAGAT TTAATGAGTA TGTGAATGAG AAAGTTATG AACTTGAAAG AGGCACGTCC	5280
AAAGAGGTTA CAGAACGAGA ACATAAAGCG ATG	5313

Patentansprüche

1. Verfahren zur In-Vivo-Rekombination homologer DNA-Sequenzen, umfassend die Schritte:
 - a) Inkubieren einer Zelle, die wenigstens zwei DNA-Strukturen enthält, die jede eine DNA-Sequenz und einen Replikationsursprung enthalten, unter Bedingungen, wobei i) wenigstens ein Replikationsursprung nicht-funk-

tionell ist und ii) die Zelle unter einem Selektionsdruck steht, der ein Wachstum der Zelle nur erlaubt, falls sie die DNA-Struktur mit dem nicht-funktionellen Ursprung enthält, wodurch eine Integration einer der DNA-Strukturen in eine der anderen und dadurch die Bildung einer hybriden DNA-Struktur begünstigt wird;

b) Verändern der Bedingungen zu Bedingungen, unter denen weniger Replikationsursprünge nicht-funktionell sind als in Schritt a), wodurch ein Auskreuzen aus der hybriden DNA-Struktur und die Bildung von DNA-Strukturen begünstigt wird, die eine rekombinierte DNA-Sequenz und einen Replikationsursprung umfassen; und
c) wenigstens einmaliges Wiederholen der Schritte a)–b).

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine DNA-Struktur ein Chromosom ist, vorzugsweise ein bakterielles Chromosom, mehr bevorzugt ein Bacillus-Chromosom, speziell ein Bacillus-subtilis-Chromosom.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–2, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine DNA-Struktur ein Vektor ist, vorzugsweise ein bakterieller Vektor, mehr bevorzugt ein Vektor, der in einer Bacillus-Zelle, speziell einer Bacillus-subtilis-Zelle, replizieren kann.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei wenigstens zwei der DNA-Konstrukte zwei verschiedene Vektoren sind.

5. Verfahren zur In-Vivo-Rekombination homologer DNA-Sequenzen, umfassend die Schritte:

a) Einfügen der homologen DNA-Sequenzen in wenigstens zwei verschiedene Vektoren, wobei die Vektoren verschiedene Replikationsursprünge enthalten;

b) Einführen der Vektoren in eine Zelle;

c) Inkubieren der Zelle unter Bedingungen, wobei i) wenigstens ein Replikationsursprung nicht-funktionell ist und ii) die Zelle unter einem Selektionsdruck steht, der ein Wachstum der Zelle nur erlaubt, falls sie die DNA-Struktur mit dem nicht-funktionellen Ursprung enthält, wodurch eine Integration einer der DNA-Strukturen in eine der anderen und dadurch die Bildung einer hybriden DNA-Struktur begünstigt wird;

d) Verändern der Bedingungen zu Bedingungen, unter denen weniger Replikationsursprünge nicht-funktionell sind als in Schritt c), wodurch ein Auskreuzen aus der hybriden DNA-Struktur und die Bildung von DNA-Strukturen begünstigt wird, die eine rekombinierte DNA-Sequenz und einen Replikationsursprung umfassen; und

e) Wiederholen der Schritte c)–d) sooft wie gewünscht, jedoch wenigstens einmal.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens ein Replikationsursprung so ausgewählt wird, dass die Replikationsrate des Vektors chemisch oder physikalisch reguliert werden kann.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens ein Replikationsursprung temperaturempfindlich ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Replikationsrate wenigstens eines Vektors durch eine Temperaturänderung reguliert werden kann.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–8, dadurch gekennzeichnet, dass die Vektoren Gene für Marker enthalten, wobei selektierbare Marker, speziell Antibiotikamarker, bevorzugt sind.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Vektoren Gene für verschiedene Marker enthalten.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei wenigstens eine DNA-Struktur nicht ori(–) umfasst, sondern nur ori(+) umfasst.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die DNA-Struktur, die nicht ori(–) umfasst, eine DNA-Struktur ist, deren Ursprung während der Bildung der hybriden DNA-Struktur funktionell ist, die gemäß einem jeden der vorhergehenden Ansprüche durchgeführt wird.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Bildung der Hybridstruktur in vivo gemessen wird, vorzugsweise mittels eines Systems von DNA-Strukturen, worin ein in-vivo-nachweisbares Protein nur exprimiert wird, nachdem die Hybridstruktur gebildet wurde.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das nachweisbare Protein ein Protein ist, das unter geeigneter Ex-

position fluoreszierend ist, und insbesondere das fluoreszierende Protein das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) oder Varianten davon ist.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Auskreuzen aus der hybriden DNA-Struktur ein erzwungenes Auskreuzungsereignis ist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei das erzwungene Auskreuzen aus der Hybridstruktur durchgeführt wird mittels:

- (i) Herstellen eines Systems, worin die DNA-Hybridstruktur keinen selektierbaren Marker exprimiert und wenigstens eine der wenigstens zwei DNA-Strukturen nach einem der vorhergehenden Ansprüche fähig ist, den selektierbaren Marker zu exprimieren;
- (ii) Inkubieren der Zelle unter selektiven Bedingungen, wodurch ein Auskreuzen der DNA-Hybridstruktur erzwungen wird, da die Zelle nur fähig ist, das Markergen zu exprimieren, nachdem das Auskreuzen der DNA-Hybridstruktur stattgefunden hat.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der selektierbare Marker in Schritt i) auf einer DNA-Struktur exprimiert wird, worin der Replikationsursprung während einer wie oben beschrieben durchgeführten, erzwungenen Integration der DNA-Strukturen in eine DNA-Hybridstruktur nicht-funktionell ist und vorzugsweise das selektierbare Markergen ein Antibiotikaresistenzgen ist.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die homologen DNA-Sequenzen DNA-Sequenzen aus wenigstens einer vorgefertigten DNA-Bibliothek umfassen.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die homologen DNA-Sequenzen zwei oder mehr verschiedene Sätze homologer DNA-Sequenzen umfassen und wobei jeder der Sätze homologer Sequenzen in ein anderes DNA-Konstrukt nach einem jeden der vorhergehenden Ansprüche eingefügt wird.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei wenigstens einer der Sätze homologer DNA-Sequenzen aus einer vorgefertigten DNA-Bibliothek abgeleitet ist und wenigstens einer der Sätze homologer DNA-Sequenzen eine DNA-Sequenz ist, die homolog zu der DNA-Bibliothek ist.

21. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Sätze homologer DNA-Sequenzen von derselben vorgefertigten DNA-Bibliothek abgeleitet sind.

22. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Sätze homologer DNA-Sequenzen von wenigstens zwei verschiedenen vorgefertigten DNA-Bibliotheken abgeleitet sind.

23. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Sätze homologer DNA-Sequenzen jeweils nur eine DNA-Sequenz enthalten.

24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zwei Sätze homologer DNA-Sequenzen „Satz A“ und „Satz B“ in vivo rekombiniert werden, umfassend die Schritte:

- a) Einfügen einer(/von) Sequenz(en) aus „Satz A“ in einen Vektor, der einen temperaturresistenten Replikationsursprung und ein Gen für einen ersten Marker enthält;
- b) Einfügen einer(/von) Sequenz(en) aus „Satz B“ in einen Vektor, der einen temperaturempfindlichen Replikationsursprung und ein Gen für einen zweiten Marker enthält;
- c) Einführen der Vektoren in eine Zelle;
- d) Inkubieren der Zelle bei einer Temperatur, bei der beide Replikationsursprünge funktionell sind, wahlweise unter einem Selektionsdruck, der Zellen mit beiden Markergenen begünstigt;
- e) Verändern der Temperatur zu einer Temperatur, bei der nur der temperaturresistente Replikationsursprung funktionell ist;
- f) wenigstens einmaliges Wiederholen der Schritte d) bis e).

25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zwei Sätze homologer DNA-Sequenzen „Satz A“ und „Satz B“ in vivo rekombiniert werden, umfassend die Schritte:

- a) Einfügen einer(/von) Sequenz(en) aus „Satz A“ in einen Vektor, der einen temperaturresistenten Replikationsursprung und ein Gen für einen ersten Marker enthält;
- b) Einfügen einer(/von) Sequenz(en) aus „Satz B“ in einen Vektor, der einen temperaturempfindlichen Replikationsursprung und ein Gen für einen zweiten Marker enthält;
- c) Einführen der Vektoren in eine Zelle;

- d) Inkubieren der Zelle bei einer Temperatur, bei der nur der temperaturresistente Replikationsursprung funktionell ist, wahlweise unter einem Selektionsdruck, der Zellen mit beiden Markergenen begünstigt;
- e) wahlweise Verändern der Temperatur zu einer Temperatur, bei der beide Replikationsursprünge funktionell sind;
- f) wenigstens einmaliges Wiederholen der Schritte d) bis e).

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–25, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle, die die DNA-Strukturen enthält, bezüglich des enzymatischen Fehlpaarungs-Reparatursystems gestört ist oder vorübergehend inaktiv ist oder eine verringerte Aktivität der Fehlpaarungsreparatur hat.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–26, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle eine Gram-positive Zelle ist, so wie eine Staphylococcus-Zelle, eine Streptococcus-Zelle, eine Bacillus-Zelle oder insbesondere eine Bacillus-subtilis-Zelle.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–26, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle eine Gram-negative Zelle ist, vorzugsweise eine Escherichia-Zelle, speziell eine E.-coli-Zelle.

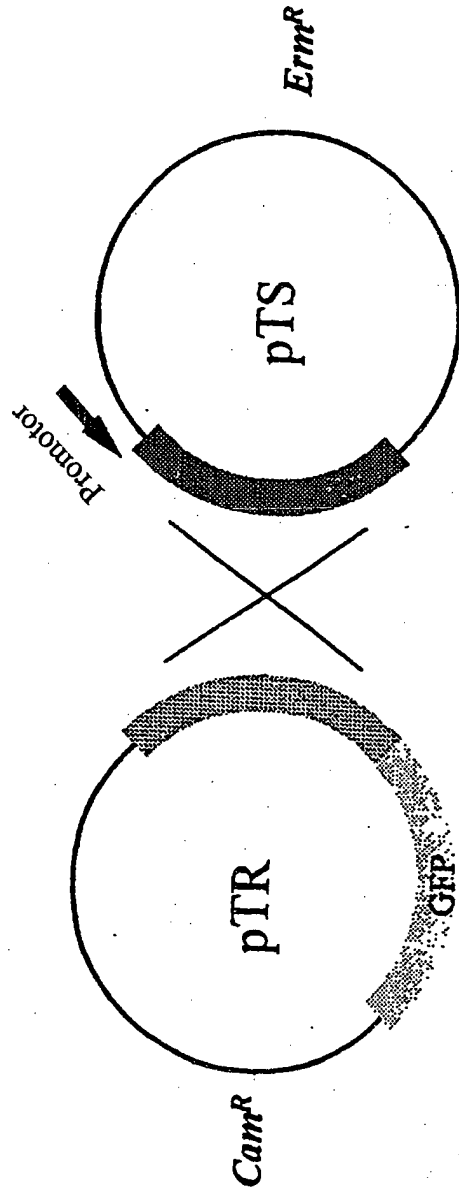
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–28, dadurch gekennzeichnet, dass die homologen DNA-Sequenzen Polypeptide, speziell Enzyme und insbesondere Enzyme wie eine Amylase, Lipase, Cutinase, Cellulase, Oxidase, Phytase und eine Protease, kodieren.

30. Verfahren zur Herstellung eines oder mehrerer rekombinanter Protein(e) mit einer gewünschten biologischen Aktivität, umfassend:

- a) Durchführen eines Verfahrens zur In-Vivo-Rekombination homologer DNA-Sequenzen nach einem jeden der vorhergehenden Ansprüche, wobei wenigstens eine (der) DNA-Struktur(en) ein Expressionsvektor ist;
- b) Exprimieren der zahlreichen verschiedenen rekombinanten Polypeptide, die von den zahlreichen verschiedenen rekombinierten DNA-Sequenzen aus Schritt a) kodiert werden; und
- c) Nachweisen oder Selektieren der zahlreichen verschiedenen rekombinanten Proteine aus Schritt b) in einem geeigneten Nachweis- oder Selektionssystem für eines oder mehrere rekombinant(e) Polypeptid(e), das eine gewünschte Aktivität besitzt.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

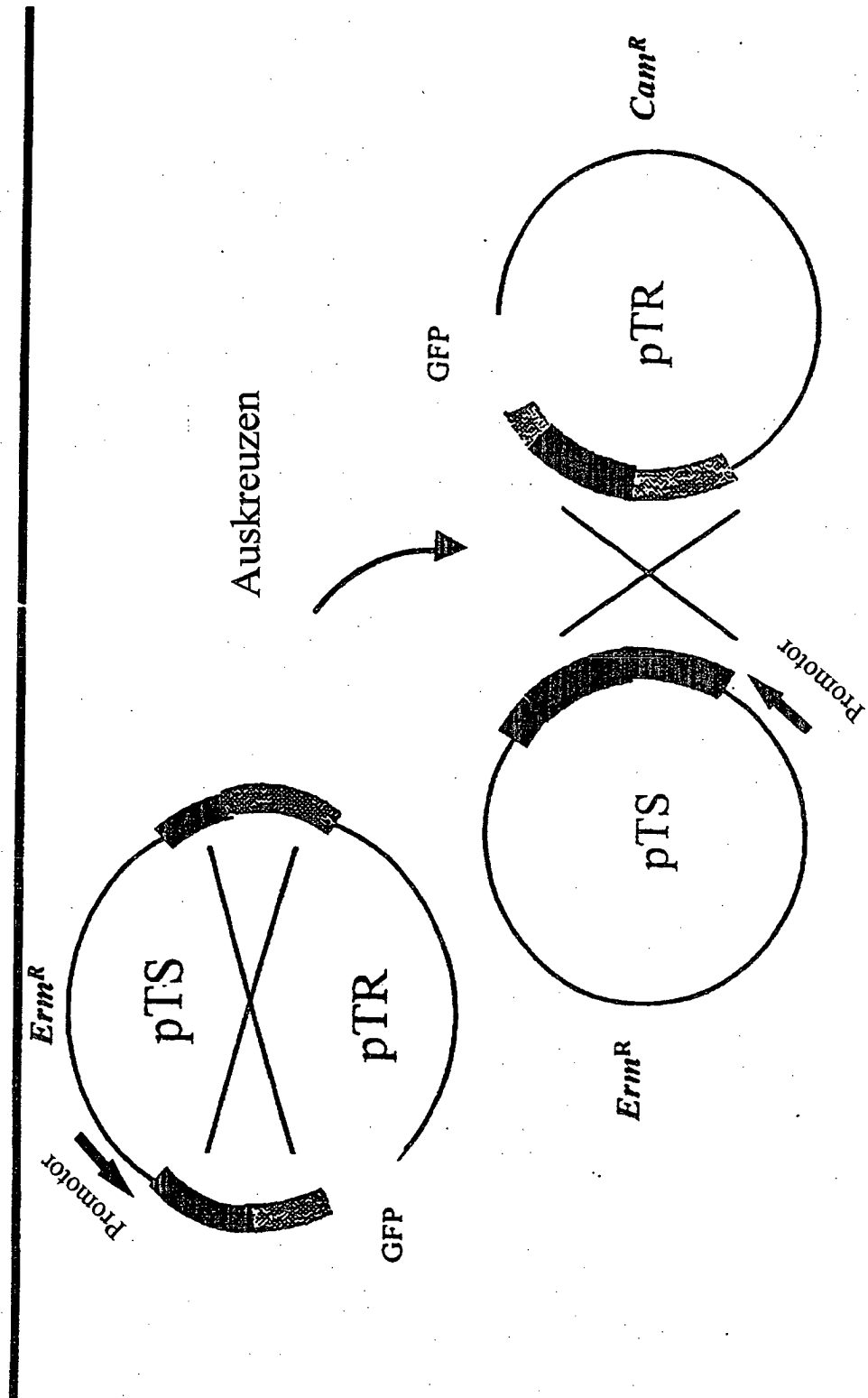
Figur 1:



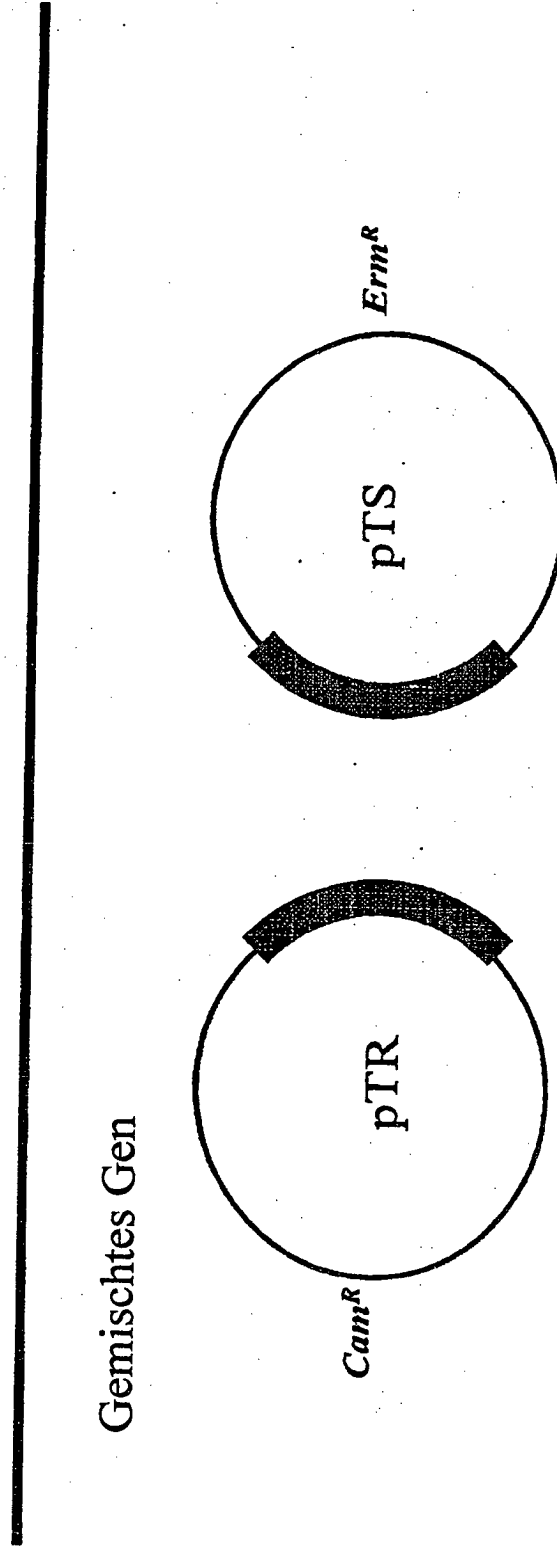
Replikation bis 50 °C
Kein Promotor führt zu
keiner Fluoreszenz.

Replikation über 45 °C
nicht möglich
Promotor steuert Expression
des aktiven Proteins

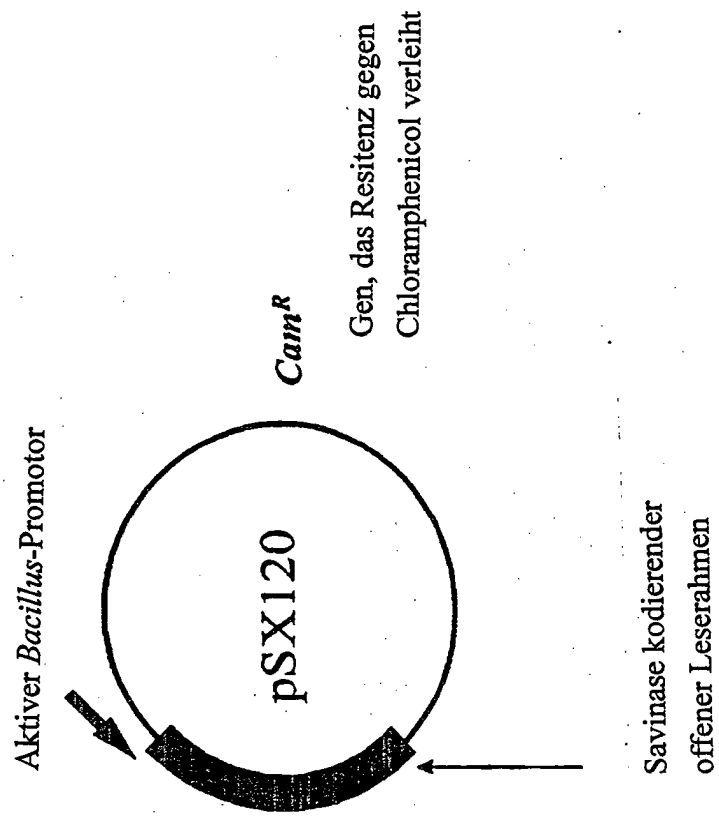
Figur 2:



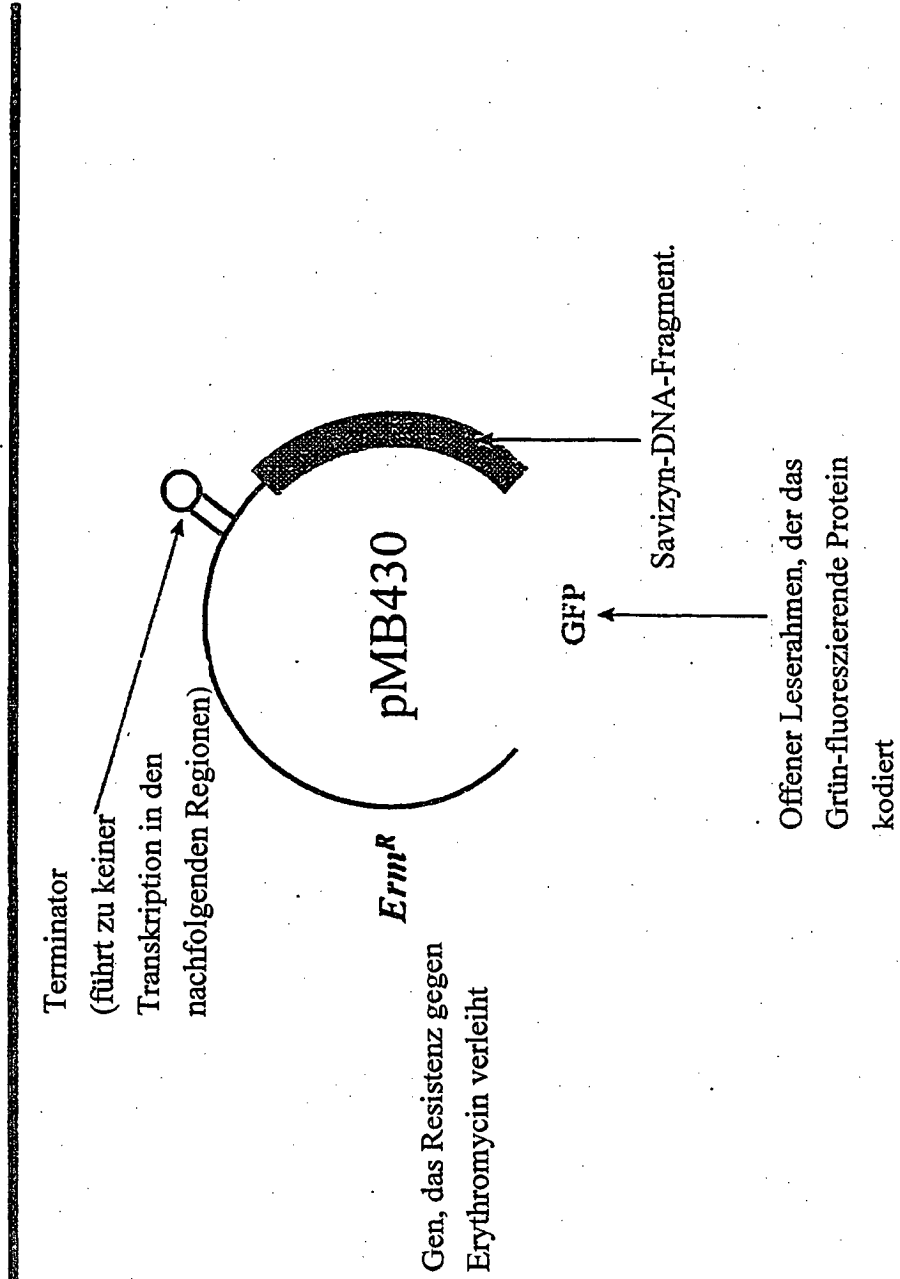
Figur 3:



Figur 4:



Figur 5:



Figur 6:

Savinase/Savizyn-Mischen

Pos. Restriktions- stelle	110	146	166	190	245	280	300	320	340	375	466	590	610	620	670	720	746	776
Klon.Nr. 1	Z	Z	Z	S	S	S	S	S	S	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
2	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	Z	Z	Z	S	S	S	S	S	S	S	Z	S	S	S	Z	Z	Z	Z
4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	Z	Z	Z	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	Z	Z	Z
6	S	S	S	S	Z	Z	Z	Z	S	S	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	S
7	Z	Z	Z	S	S	S	S	S	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
8	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	S	S	Z	S	S	S	S	S	Z	Z
9	Z	Z	Z	S	S	S	S	S	S	S	S	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
10	Z	Z	Z	S	S	S	S	S	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
11	Z	Z	Z	S	S	S	S	S	S	S	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
12	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	S	S	Z	S	S	S	S	S	S	S