(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
13. Februar 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/012101 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C12N 15/11, 15/55, 50/80, 9/16, 1/15, C07K 14/37, C12P 25/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/08359

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. Juli 2002 (26.07.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

101 36 664.7	27. Juli 2001 (27.07.2001)	DE
101 36 665.5	27. Juli 2001 (27.07.2001)	DE
102 21 907.9	16. Mai 2002 (16.05.2002)	DE
102 21 916.8	16. Mai 2002 (16.05.2002)	DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **BASF AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **KAROS, Marvin** [DE/DE]; Fröbelstrsse 2, 67433 Neustadt (DE). **ALTHÖFER, Henning** [DE/DE]; Im Höhnhausen 26, 67157 Wachenheim (DE). **KRÖGER, Burkhard** [DE/DE]; Im Waldhof 1, 67117 Limburgerhof (DE). **REVUELTA DOVAL, Jose, L.** [ES/ES]; Grillo 11, 4 E, E-37001 Salamanca (ES).

(74) Anwälte: **REITSTÖTTER, KINZEBACH & PARTNER (GBR)** usw.; Sternwartstrasse 4, 81679 München (DE).

(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, 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.

(54) **Title:** NOVEL GENETIC PRODUCTS OF ASHBYA GOSSYPII, ASSOCIATED WITH THE MECHANISMS OF SIGNAL TRANSDUCTION AND ESPECIALLY WITH THE IMPROVEMENT OF VITAMIN B2 PRODUCTION

(54) **Bezeichnung:** NEUE GENPRODUKTE AUS ASHBYA GOSSYPII, DIE MIT DEN MECHANISMEN DER SIGNAL-TRANSDUKTION UND ISNBESONDERE MIT DER VERBESSERUNG DER VITAMIN B2-PRODUKTION ASSOZIIERT SIND

(57) **Abstract:** The invention relates to novel polynucleotides of *Ashbya gossypii*, oligonucleotides which hybridise therewith, expression cassettes and vectors containing said poynucleotides, micro-organisms transformed thereby, polypeptides coded by said polynucleotides, and the use of the novel polypeptides and polynucleotides as targets for improving signal transduction mechanisms and especially for improving the production of vitamin B2 in micro-organisms of the species *Ashbya*.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft neuartige Polynukleotide aus *Ashbya gossypii* ; damit hybridisierende Oligonukleotide; Expressionskassetten und Vektoren, welche diese Polynukleotide enthalten; damit transformierte Mikroorganismen; von diesen Polynukleotiden kodierte Polypeptide; und die Anwendung der neuen Polypeptide und Polynukleotide als Targets zur Verbesserung der Signaltransduktionsmechanismen und insbesondere der Verbesserung der Vitamin B2-Produktion in Mikroorganismen der Gattung *Ashbya*.

WO 03/012101 A1

NEUE GENPRODUKTE AUS ASHBYA GOSSYPII DIE MIT DEN MECHANISMEN DER SIGNALTRANSDUKTION UND ISNBESONDERE MIT DER VERBESSERUNG DER VITAMIN B2-PRODUKTION ASSOZIIERT SIND

Beschreibung

Neue Genprodukte aus Ashbya gossypii, die mit den Mechanismen der Signaltransduktion assoziiert sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige Polynukleotide aus *Ashbya gossypii*; damit hybridisierende Oligonukleotide; Expressionskassetten und Vektoren, welche diese Polynukleotide enthalten; damit transformierte Mikroorganismen; von diesen Polynukleotiden kodierte Polypeptide; und die Anwendung der neuen Polypeptide und Polynukleotide als Targets zur Modulation der Signaltransduktionsmechanismen und insbesondere der Verbesserung der Vitamin B2-Produktion in Mikroorganismen der Gattung *Ashbya*.

Vitamin B2 (Riboflavin, Lactoflavin) ist ein alkali- und lichtempfindliches, in Lösung gelbgrün fluoreszierendes Vitamin. Vitamin B2-Mangel kann zu Ektodermschäden, insbesondere Linsentrübung, Keratitis, Korneavaskularisation, zu neurovegetativen und urogenitalen Störungen führen. Vitamin B2 ist Vorläufer für die neben NAD^+ und $NADP^+$ wichtigen biologischen Wasserstoffüberträger-Moleküle FAD und FMN. Diese werden aus Vitamin B2 durch Phosphorylierung (FMN) und anschließende Adenylierung (FAD) gebildet.

Vitamin B2 wird in Pflanzen, Hefen und vielen Mikroorganismen aus GTP und Ribulose-5-phosphat synthetisiert. Der Reaktionsweg beginnt mit dem Öffnen des Imidazolrings von GTP und Abspaltung eines Phosphatrestes. Durch Desaminierung, Reduktion und Abspaltung des verbleibenden Phosphats entsteht 5-Amino-6-ribitylamino-2,4-pyrimidinon. Die Reaktion dieser Verbindung mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat führt zum bicyclischen Molekül 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin. Diese Verbindung wird durch Dismutation, bei der eine 4-Kohlenstoff-Einheit übertragen wird, in die tricyclische Verbindung Riboflavin umgesetzt.

Vitamin B2 kommt in vielen Gemüsen und in Fleisch vor, weniger in Getreideprodukten. Der tägliche Vitamin B2-Bedarf eines Erwachsenen liegt bei etwa 1,4 bis 2 mg. Hauptabbauprodukt der Coenzyme FMN und FAD beim Menschen ist wiederum Riboflavin, welches als solches ausgeschieden wird.

Vitamin B2 stellt damit ein wichtiges Nahrungsergänzungsmittel für Mensch und Tier dar. Es besteht daher das Bestreben, Vitamin B2 in technischem Maßstab zugänglich zu machen. Es wurde daher vorgeschlagen, Vitamin B2 auf mikrobiologischem Weg zu synthetisieren. Brauchbare Mikroorganismen hierfür sind beispielsweise *Bacillus subtilis*, die Ascomyceten *Eremothecium ashbyii, Ashbya gossypii* sowie die Hefen *Candida flareri* und *Saccharomyces cerevisiae*. Die hierzu verwendeten Nährmedien umfassen Melasse oder Pflanzenöle als Kohlenstoffquelle,

anorganische Salze, Aminosäuren, tierische oder pflanzliche Peptone und Proteine sowie Vitaminzusätze. In sterilen aeroben submersen Verfahren erhält man pro Liter Kulturbrühe Ausbeuten von mehr als 10 g Vitamin B2 innerhalb weniger Tage. Voraussetzung sind gute Belüftung der Kultur, sorgfältiges Rühren und Einstellung von Temperaturen unter etwa 30°C. Nach Abtrennen der Biomasse, Eindampfen und Trocknen des Konzentrates erhält man ein mit Vitamin B2 angereichertes Produkt.

Die mikrobiologische Produktion von Vitamin B2 ist beispielsweise beschrieben in der WO-A-92/01060, der EP-A-0 405 370 und EP-A-0 531 708.

Eine Übersicht über Bedeutung, Vorkommen, Herstellung, Biosynthese und Verwendung von Vitamin B2 ist beispielsweise in Ullmann's Encyclopaedia of Industrial Chemistry, Band A27, Seiten 521 ff. zu finden.

Alle lebende Zellen besitzen komplexe katabolische und anabolische Stoffwechselaktivitäten, die durch viele untereinander verbundene Stoffwechselwege gewährleistet werden. Um eine Balance zwischen diesen verschiedenen Teilen des Stoffwechsels aufrecht zu erhalten, muß die Zelle ein gut abgestimmtes regulatorisches Netzwerk unterhalten. Hierbei müssen vor allem Signale von außerhalb der Zelle, die z.B. den extrazellulär verfügbaren Nahrungsstatus anzeigen, in die Zelle weitergeleitet und dort von Signalübertragungssystemen zum Ort der Zellantwort gebracht werden (Signaltransduktion). Diese Zellantwort kann z.B. die Synthese oder Regulation von Stoffwechselenzymen, die Initiierung einer Antwort auf Stress oder die Regulation des Zellwachstums bedingen.

Die Induktion oder Repression der Enzymsynthese kann sowohl auf Ebene der Transkription als auch auf Ebene der Translation stattfinden. Die Genexpression in Eukaryonten wird durch verschiedene Mechanismen reguliert (siehe Überblicksartikel z.B. Lewin, B (1990) Genes IV, Kapitel 3 and Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons). In Eukaryonten kann ein extrazelluläres Signal entweder von in der Plasmamembran lokalisierten Rezeptoren erkannt werden, oder -falls das Signal eine lipophile Chemikalie darstellt und deshalb in die Zelle diffundieren kann- von Rezeptoren in der Zelle empfangen werden. Es gibt drei Klassen von Zelloberflächen-Rezeptoren: Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und solche die selbst katalytische Aktivität besitzten (Nishizuka, Y. (1992) Trends Biochem. Sci., 17, 367 – 443). Diese Rezeptoren leiten das Signal ins Zellinnere weiter.

Darüber hinaus werden Signale die durch physiologische Zustände in der Zelle bestimmt werden (z.B. Teilungsstadium der Zelle, Zellgröße) von intrazellulären Systemen erkannt und zum jeweiligen Ort der Zellantwort weitergeleitet.

Häufig werden die von den Rezeptoren empfangenen Signale durch GTP-spaltende Proteine (G-Proteine; Purin Nukleotid bindendes Protein) weitergeleitet. Diese G-Proteine können nach Aktivierung durch die Rezeptoren andere Enzyme anschalten, so daß das Signal weitergegeben wird. Diese Enzyme können verschiedene Aktivitäten aufweisen. Häufig handelt es sich hierbei um Kinasen, die Phosphatreste auf andere Proteine übertragen können und so ihren Aktivitätszustand ändern. Um den Aktivierungszustand wieder zu ändern, besitzt die Zelle auch spezifische Phosphatasen, die die Phosphatreste wieder abspalten können (Cohen, P. (1989) Annu.Rev.Biochem., 58, 453 – 508).

Die Signaltransduktion gibt der Zelle die Möglichkeit auch eine große Anzahl, komplexer Signale miteinander zu verschalten und so die richtige Zellantwort zu erzeugen. Diese Zellantwort kann z.B. die Bildung einer kommerziell interessanten Feinchemikalie sein, so daß die Verstärkung von den jeweiligen Signaltransduktionswegen eine Erhöhung der Bildung von Wertprodukten ermöglicht.

Die Nutzung von Genen der Signaltransduktion zur Generierung von Mikroorganismen, vorzugsweise der Gattung *Ashbya*, insbesondere von *Ashbya gossypii* Stämmen, mit einer verbesserten Zellantwort ist noch nicht beschrieben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung neuer Targets zur Beeinflussung der Zellantwort in Mikroorganismen der Gattung *Ashbya,* insbesondere in *Ashbya gossypii.* Insbesondere besteht die Aufgabe, die Zellantwort in derartigen Mikroorganismen zu steuern und die Synthese gewünschter Produkte zu erhöhen. Eine weitere Aufgabe ist die Verbesserung der Vitamin B2-Produktion durch derartige Mikroorganismen.

Gelöst wird obige Aufgabe durch Bereitstellung kodierender Nukleinsäuresequenzen, welche in Ashbya gossypii während der Vitamin B2-Produktion hoch- bzw. niederreguliert (basierend auf Ergebnissen, ermittelt mit Hilfe der im experimentellen Teil näher beschriebenen MPSS-Analysenmethode) sind, und zwar insbesondere:

a) eine, vorzugsweise hochregulierte, Nukleinsäuresequenz, welche für ein Protein mit der Funktion einer Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase kodiert.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform dieses Aspekts der Erfindung wurde ein DNA-Klon isoliert, welche für eine charakteristische Teilsequenz der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz kodiert und die interne Bezeichnung „Oligo 55" trägt.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wurde erfindungsgemäß ein DNA-Klon isoliert, der für die Vollsequenz der erfindungsgemäßen Nukleinsäure kodiert und die interne Bezeichnung „Oligo 55v" trägt.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Polynukleotid, umfassend eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Polynukleotid, umfassend eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 3 oder ein Fragment davon. Vorzugsweise sind die Polynukleotide aus einem Mikroorganismus der Gattung *Ashbya,* insbesondere *A. gossypii* isolierbar. Außerdem sind Gegenstand der Erfindung die dazu komplementären Polynukleotide; und die von diesen Polynukleotiden durch Entartung des genetischen Codes abgeleiteten Sequenzen.

Die Inserts von „Oligo 50" und „Oligo 50v" besitzen mit dem MIPS Tag „INP54" aus *S. cerevisiae* signifikante Homologien. Die Inserts besitzen eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 bzw. SEQ ID NO: 3. Die vom korrespondierenden Gegenstrang zu SEQ ID NO:1 bzw. vom kodierenden Strang gemäß SEQ ID NO:3 abgeleitete Aminosäuresequenz bzw. Aminosäureteilsequenz besitzt signifikante Sequenzhomologie mit einer Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase aus S. cerevisiae.

b) eine, vorzugsweise hochregulierte, Nukleinsäuresequenz, welche für ein Protein mit ATP und/oder GTP Bindungsaktivität kodiert. Insbesondere besitzt es starke Ähnlichkeit zum Ylf1p/ATP/GTP-Bindungsstellenmotiv A (P-Loop).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform diese Aspekts der Erfindung wurde ein DNA-Klon isoliert, welche für eine charakteristische Teilsequenz der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz kodiert und die interne Bezeichnung „Oligo 176" trägt.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wurde erfindungsgemäß ein DNA-Klon isoliert, der für die Vollsequenz der erfindungsgemäßen Nukleinsäure kodiert und die interne Bezeichnung „Oligo 176v" trägt.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein Polynukleotid, umfassend eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 5. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Polynukleotid, umfassend eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 7 oder ein Fragment davon. Vorzugsweise sind die Polynukleotide aus einem Mikroorganismus der Gattung *Ashbya,* insbesondere *A. gossypii* isolierbar. Außerdem sind Gegenstand der Erfindung die dazu komplementären Polynukleotide; und die von diesen Polynukleotiden durch Entartung des genetischen Codes abgeleiteten Sequenzen.

Die Inserts von „Oligo 176" und „Oligo 176v" besitzen mit dem MIPS Tag „Ybr025c" aus *S. cerevisiae* signifikante Homologien. Die Inserts besitzen eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 5 bzw. SEQ ID NO: 7. Die vom korrespondierenden Gegenstrang von SEQ ID NO:5 bzw. von kodierenden Strang gemäß SEQ ID NO:7 abgeleitete Aminosäuresequenz bzw. Aminosäureteilsequenz besitzt signifikante Sequenzhomologie zum Ylf1p/ATP/GTP-Bindungsstellenmotiv A (P-Loop) aus S. cerevisiae.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Oligonukleotide, welche mit einem der obigen Polynukleotide, insbesondere unter stringenten Bedingungen, hybridisieren.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Polynukleotide, welche mit einem der erfindungsgemäßen Oligonukleotide hybridisieren und für ein Genprodukt aus Mikroorganismen der Gattung *Ashbya* oder ein funktionales Äquivalent dieses Genproduktes kodieren.

Die Erfindung betrifft weiterhin Polypeptide bzw. Proteine, welche von den oben beschriebenen Polynukleotiden kodiert werden; sowie Peptidfragmente davon, welche eine Aminosäuresequenz aufweisen, die wenigstens 10 zusammenhängende Aminosäurereste gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 8 umfasst; sowie funktionale Äquivalente der erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. Proteine.

Funktionale Äquivalente unterscheiden sich dabei von den erfindungsgemäß konkret offenbarten Produkten in ihrer Aminosäuresequenz durch Addition, Insertion, Substitution, Deletion oder Inversion an wenigstens einer, wie z.B. 1 bis 30 oder 1 bis 20 oder 1 bis 10, Sequenzpositionen ohne die ursprünglich beobachtete und durch Sequenzvergleich mit anderen Proteinen ableitbare Proteinfunktion zu verlieren. Damit können Äquivalente im wesentlichen identische, höhere oder niedrigere Aktivitäten im Vergleich zum nativen Protein besitzen.

Weitere Gegenstände der Erfindung betreffen Expressionskassetten zur rekombinanten Produktion erfindungsgemäßer Proteine, umfassend in operativer Verknüpfung mit wenigstens einer

regulativen Nukleinsäuresequenz eine der oben definierten Nukleinsäuresequenzen; sowie rekombinante Vektoren, umfassend wenigstens eine solche erfindungsgemäße Expressionskassette.

Erfindungsgemäß bereitgestellt werden außerdem prokaryotische oder eukaryotische Wirte, welche mit wenigstens einem Vektor obigen Typs transformiert sind. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden solche prokaryotischen oder eukaryotischen Wirte bereitgestellt, in welchen die funktionale Expression wenigstens eines Gens moduliert (z.B. Inhibition oder Überexpression) ist, das für ein erfindungsgemäßes Polypeptid nach obiger Definition kodiert; oder in welchen die biologische Aktivität eines Polypeptids nach obiger Definition erniedrigt oder erhöht ist. Bevorzugte Wirte sind ausgewählt unter Ascomyceten (Schlauchpilzen), insbesondere solchen der Gattung *Ashbya* und vorzugsweise Stämmen von *A. gossypii*.

Eine Modulation der Genexpression im obigen Sinn umfasst sowohl deren Inhibition, z.B. durch Blockade einer Expressionsstufe (insbesondere Transkription oder Translation) oder eine gezielte Überexpression eines Gens (z.B. durch Modifikation regulativer Sequenzen oder Erhöhung der Kopienzahl der kodierenden Sequenz).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, eines erfindungsgemäßen Vektors oder eines erfindungsgemäßen Wirts zur mikrobiologischen Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, eines erfindungsgemäßen Vektors oder eines erfindungsgemäßen Wirts zur rekombinanten Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids nach obiger Definition.

Erfindungsgemäß wird weiterhin ein Verfahren zur Nachweis bzw. zur Validierung eines Effektortargets für die Modulation der mikrobiologischen Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon bereitgestellt. Dabei behandelt man einen Mikroorganismus, der zur mikrobiologischen Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon befähigt ist, mit einem Effektor, welcher mit einem Target, ausgewählt unter einem erfindungsgemäßen Polypeptid nach obiger Definition oder einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz, wechselwirkt (wie z.B. an diese nicht-kovalent bindet), den Einfluß des Effektors auf die Menge des mikrobiologisch produzierten Vitamins B2 und/oder des Präkursors und/oder eines Derivats davon validiert; und das Target gegebenenfalls isoliert. Die Validierung erfolgt dabei bevorzugt durch direkten Vergleich mit der mikrobiologischen Vitamin B2-Produktion in Abwesenheit des Effektors unter ansonsten gleichen Bedingungen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Modulation (in Bezug auf Menge und/oder Geschwindigkeit) der mikrobiologischen Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon, wobei man einen Mikroorganismus, der zur mikrobiologischen Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon befähigt ist, mit einem Effektor behandelt, welcher mit einem Target, ausgewählt unter einem erfindungsgemäßen Polypeptid nach obiger Definition oder einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz, wechselwirkt.

Als bevorzugte Beispiele für oben genannte Effektoren sind zu nennen:

a) Antikörper oder antigenbindene Fragmenten davon;

b) von a) verschiedenen Polypeptid-Liganden, welche mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid wechselwirken;

c) niedermolekulare Effektoren, welche die biologische Aktivität eines erfindungsgemäßen Polypeptids modulieren;

d) Antisense-Nukleinsäuresequenzen, welche mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz wechselwirken.

Oben genannte Effektoren mit Spezifität für wenigstens eines der oben definierten erfindungsgemäßen Tragets sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiologischen Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon, wobei man einen Wirt gemäß obiger Definition unter die Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon begünstigenden Bedingungen kultiviert und das(die) gewünschte(n) Produkt(e) aus dem Kulturansatz isoliert. Bevorzugt ist dabei, daß man den Wirt vor und/oder während der Kultivierung mit einem Effektor nach obiger Definition behandelt. Ein bevorzugter Wirt ist dabei ausgewählt unter Mikroorganismen der Gattung *Ashbya*; insbesondere transformiert, wie oben beschrieben.

Ein letzter Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung eines erfindungsgemäßen Polynukleotids oder Polypeptids als Target zur Modulation der Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon in einem Mikroorganismus der Gattung *Ashbya*.

Figurenbeschreibung:

Figur 1 zeigt ein Alignment zwischen einer erfindungsgemäßen Aminosäure-Teilsequenz (entsprechend dem Gegenstrang zu Position 1209 bis 964 in SEQ ID NO:1) (obere Sequenz) und einer Teilsequenz des MIPS-Tags INP54 aus S. cerevisiae (untere Sequenz). Identische Sequenzpositionen sind zwischen den beiden Sequenzen angegeben. Ähnliche Sequenzpositionen sind mit „+" gekennzeichnet.

Figur 2 zeigt ein Alignment zwischen einer erfindungsgemäßen Aminosäure-Teilsequenz (entsprechend dem Gegenstrang zu Position 507 bis 1 in SEQ ID NO:5) (obere Sequenz) und einer Teilsequenz des MIPS-Tags Ybr025c aus S. cerevisiae (untere Sequenz). Identische Sequenzpositionen sind zwischen den beiden Sequenzen angegeben. Ähnliche Sequenzpositionen sind mit „+" gekennzeichnet.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung:

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle kodieren Polypeptide bzw. Proteine, die hier als Proteine der Signaltranduktion (z.B. mit Aktivität bezüglich der Zellantwort auf extrazellulärer Signale) oder kurz als „ST-Proteine" bezeichnet werden. Diese ST-Proteine haben z.B. eine Funktion bei der Synthese oder Regulation von Stoffwechselenzymen, welche die Initiierung einer Zellantwort oder die Regulation des Zellwachstums bedingen. Aufgrund der Verfügbarkeit von in *Ashbya gossypii* verwendbaren Klonierungsvektoren, wie z.B. offenbart in Wright und Philipsen (1991) Gene, 109, 99–105., und von Techniken zur genetischen Manipulation von *A. gossypii* und den verwandten *Hefe*-Arten lassen sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur genetischen Manipulation dieser Organismen, insbesondere von *A. gossypii* verwenden, um sie als Produzenten von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivate davon besser und effizienter zu machen. Diese verbesserte Produktion oder Effizienz kann aufgrund einer direkten Wirkung der Manipulation eines erfindungsgemäßen Gens oder einer indirekten Wirkung einer solchen Manipulation erfolgen.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Bereitstellung neuer Molekülen, die hier als ST-Nukleinsäuren und ST-Proteine bezeichnet werden und an der Signaltransduktion, insbesondere in *Ashbya gossypii*, (z.B. bei der Synthese oder Regulation von Stoffwechselenzymen) beteiligt sind. Die Aktivität der erfindungsgemäßen ST-Moleküle in *A. gossypii* beeinflußt die Vitamin B2-Produktion durch diesen Organismus. Vorzugsweise wird die Aktivität der erfindungsgemäßen ST-Moleküle so moduliert, daß die Stoffwechsel- und/oder Energiewege von *A. gossypii*, an denen die erfindungsgemäßen ST-Proteine teilnehmen, hinsichtlich der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Vitamin B2-Produktion moduliert werden, was entweder direkt oder indi-

rekt die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Vitamin B2-Produktion in *A. gossypii* moduliert.

Die erfindungsgemäß bereitgestellten Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise aus dem Genom eines *Ashbya gossypii*-Stammes isolierbar, der von der American Type Culture Collection unter der Bezeichnung ATCC 10895 frei erhältlich ist.

Verbesserung der Vitamin B2-Produktion:

Es gibt eine Reihe von möglichen Mechanismen, über welche man durch Veränderung von Menge und/oder Aktivität eines erfindungsgemäßen ST-Proteins die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Vitamin B2 durch einem *A. gossypii*-Stamm direkt beeinflussen kann.

So kann durch eine effizientere Signaltransduktion, die Zellantwort der Zelle verstärkt und damit die Bildung von gewünschten Wertprodukten erhöht werden. Auch können die Zellen robuster gegen äußere Einflüsse gemacht werden, so daß die Lebensfähigkeit und damit die Produktivität im Fermenter erhöht wird.

Die Mutagenese von einem oder mehreren erfindungsgemäßen ST-Proteinen kann auch zu ST-Proteinen mit geänderten (erhöhten oder verminderten) Aktivitäten führen, die indirekt die Produktion des gewünschten Produkts aus *A. gossypii* beeinflussen. Beispielsweise kann man mit Hilfe der ST-Proteine verschiedene Enzyme anschalten, z.B. Kinasen oder Phosphatasen, die den Phosphorylierungsgrad und damit die Aktivität weiterer Enzyme, die den Stoffwechsel der Zelle wesentlich beeinflussen, regeln. Durch Verbesserung von Wachstum und Vermehrung dieser veränderten Zellen ist es möglich, die Lebensfähigkeit der Zellen in Kulturen im Großmaßstab zu steigern und auch ihre Teilungsrate so zu verbessern, daß eine vergleichsweise größere Anzahl von produzierenden Zellen in der Fermenterkultur überleben kann. Die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion kann zumindest aufgrund der Anwesenheit einer größeren Anzahl lebensfähiger Zellen, die jeweils das gewünschte Produkt produzieren, erhöht werden.

Polypeptide:

Gegenstand der Erfindung sind Polypeptide, welche die oben genannten Aminosäuresequenzen oder charakteristische Teilsequenzen davon umfassen und/oder von den hierin beschriebenen Nukleinsäuresequenzen kodiert werden.

Erfindungsgemäß mit umfasst sind ebenfalls „funktionale Äquivalente" der konkret offenbarten neuen Polypeptide.

„Funktionale Äquivalente" oder Analoga der konkret offenbarten Polypeptide sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Polypeptide, welche weiterhin die gewünschte biologische Aktivität, (wie z.B. Substratspezifität) besitzen.

Unter "funktionalen Äquivalenten" versteht man erfindungsgemäß insbesondere Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Aminosäure aufweisen aber trotzdem eine der oben genannten biologischen Aktivitäten besitzen. "Funktionale Äquivalente" umfassen somit die durch eine oder mehrere Aminosäure-Additionen, -Substituenten, -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die genannten Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit dem erfindungsgemäßen Eigenschaftsprofil führen. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Reaktivitätsmuster zwischen Mutante und unverändertem Polypeptid qualitativ übereinstimmen, d.h. beispielsweise gleiche Substrate mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.

„Funktionale Äquivalente" im obigen Sinne sind auch Präkursoren der beschriebenen Polypeptide sowie funktionale Derivate und Salze der Polypeptide. Unter dem Ausdruck „Salze" versteht man sowohl Salze von Carboxylgruppen als auch Säureadditionssalze von Aminogruppen der erfindungsgemäßen Proteinmoleküle. Salze von Carboxylgruppen können in an sich bekannter Weise hergestellt werden und umfassen anorganische Salze, wie zum Beispiel Natrium-, Calcium-, Ammonium-, Eisen- und Zinksalze, sowie Salze mit organischen Basen, wie zum Beispiel Aminen, wie Triethanolamin, Arginin, Lysin, Piperidin und dergleichen. Säureadditionssalze, wie zum Beispiel Salze mit Mineralsäuren, wie Salzsäure oder Schwefelsäure und Salze mit organischen Säuren, wie Essigsäure und Oxalsäure sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

„Funktionale Derivate" erfindungsgemäßer Polypeptide können an funktionellen Aminosäure-Seitengruppen oder an deren N- oder C-terminalen Ende mit Hilfe bekannter Techniken ebenfalls hergestellt werden. Derartige Derivate umfassen beispielsweise aliphatische Ester von Carbonsäuregruppen, Amide von Carbonsäuregruppen, erhältlich durch Umsetzung mit Ammoniak oder mit einem primären oder sekundären Amin; N-Acylderivate freier Aminogruppen, hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen; oder O-Acylderivate freier Hydroxygruppen, hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen.

"Funktionale Äquivalente" umfassen natürlich auch Polypeptide welche aus anderen Organismen, zugänglich sind, sowie natürlich vorkommende Varianten. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen und in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente Enzyme ermitteln.

„Funktionale Äquivalente" umfassen ebenfalls Fragmente, vorzugsweise einzelne Domänen oder Sequenzmotive, der erfindungsgemäßen Polypeptide, welche z.B. die gewünschte biologische Funktion aufweisen.

„Funktionale Äquivalente" sind außerdem Fusionsproteine, welche ein der oben genannten Polypeptidsequenzen oder davon abgeleitete funktionale Äquivalente und wenigstens eine weitere, davon funktionell verschiedene, heterologe Sequenz in funktioneller N- oder C-terminaler Verknüpfung (d.h. ohne gegenseitigen wesentliche funktionelle Beeinträchtigung der Fusionsproteinteile) aufweisen. Nichtlimitiernde Beispiele für derartige heterologe Sequenzen sind z.B. Signalpeptide, Enzyme, Immunoglobuline, Oberflächenantigene, Rezeptoren oder Rezeptorliganden.

Erfindungsgemäß mit umfasste „funktionale Äquivalente" sind Homologe zu den konkret offenbarten Proteinen. Diese besitzen wenigstens 60 %, vorzugsweise wenigstens 75% ins besondere wenigsten 85 %, wie z.B. 90%, 95% oder 99%, Homologie zu einer der konkret offenbarten Sequenzen, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad, Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448.

Im Falle einer möglichen Proteinglykosylierung umfassen erfindungsgemäße Äquivalente Proteine des oben bezeichneten Typs in deglykosylierter bzw. glykosylierter Form sowie durch Veränderung des Glykosylierungsmusters erhältliche abgewandelte Formen.

Homologe der erfindungsgemäßen Proteine oder Polypeptide können durch Mutagenese erzeugt werden, z.B. durch Punktmutation oder Verkürzung des Proteins. Der Begriff "Homolog", wie er hier verwendet wird, betrifft eine variante Form des Proteins, die als Agonist oder Antagonist der Protein-Aktivität wirkt.

Homologe der erfindungsgemäßen Proteine können durch Screening kombinatorischer Banken von Mutanten, wie z.B. Verkürzungsmutanten, identifiziert werden. Beispielsweise kann eine variegierte Bank von Protein-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt werden, wie z.B. durch enzymatisches Ligieren eines Gemisches synthetischer Oligonukleotide. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller

Homologer aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt werden, und das synthetische Gen kann dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Gensatzes ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher Sequenzen in einem Gemisch, die den gewünschten Satz an potentiellen Proteinsequenzen codieren. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind dem Fachmann bekannt (Z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

Zusätzlich können Banken von Fragmenten des Protein-Codons verwendet werden, um eine variegierte Population von Protein-Fragmenten zum Screening und zur anschließenden Selektion von Homologen eines erfindungsgemäßen Proteins zu erzeugen. Bei einer Ausführungsform kann eine Bank von kodierenden Sequenzfragmenten durch Behandeln eines doppelsträngigen PCR-Fragmentes einer kodierenden Sequenz mit einer Nuklease unter Bedingungen, unter denen ein Nicking nur etwa einmal pro Molekül erfolgt, Denaturieren der doppelsträngigen DNA, Renaturieren der DNA unter Bildung doppelsträngiger DNA, die Sense-/Antisense-Paare von verschiedenen genickten Produkten umfassen kann, Entfernen einzelsträngiger Abschnitte aus neu gebildeten Duplices durch Behandlung mit S1-Nuclease und Ligieren der resultierenden Fragmentbank in einen Expressionsvektor erzeugt werden. Durch dieses Verfahren kann eine Expressionsbank hergeleitet werden, die N-terminale, C-terminale und interne Fragmente mit verschiedenen Größen des erfindungsgemäßen Proteins kodiert.

Im Stand der Technik sind mehrere Techniken zum Screening von Genprodukten kombinatorischer Banken, die durch Punktmutationen oder Verkürzung hergestellt worden sind, und zum Screening von cDNA-Banken auf Genprodukte mit einer ausgewählten Eigenschaft bekannt. Diese Techniken lassen sich an das schnelle Screening der Genbanken anpassen, die durch kombinatorische Mutagenese von erfindungsgemäßer Homologen erzeugt worden sind. Die am häufigsten verwendeten Techniken zum Screening großer Genbanken, die einer Analyse mit hohem Durchsatz unterliegen, umfassen das Klonieren der Genbank in replizierbare Expressionsvektoren, Transformieren der geeigneten Zellen mit der resultierenden Vektorenbank und Exprimieren der kombinatorischen Gene unter Bedingungen, unter denen der Nachweis der gewünschten Aktivität die Isolation des Vektors, der das Gen codiert, dessen Produkt nachgewiesen wurde, erleichtert. Recursive-Ensemble-Mutagenese (REM), eine Technik, die die Häufigkeit funktioneller Mutanten in den Banken vergrößert, kann in Kombination mit den Screeningtests verwendet werden, um Homologe zu identifizieren (Arkin und Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331).

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können rekombinant hergestellt werden (vgl. folgende Abschnitte) oder können in nativer Form unter Anwendung klassischer biochemischer Arbeitsweisen (vgl. Cooper, T. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin) aus Mikroorganismen, insbesondere solchen der Gattung Ashbya, isoliert werden.

Nukleinsäuresequenzen:

Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen (einzel- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen, wie z.B. cDNA und mRNA), kodierend für eines der obigen Polypeptide und deren funktionalen Äquivalenten, welche z.B. unter Verwendung künstlicher Nukleotidanaloga zugänglich sind.

Die Erfindung betrifft sowohl isolierte Nukleinsäuremoleküle, welche für erfindungsgemäße Polypeptide bzw. Proteine oder biologisch aktive Abschnitte davon kodieren, sowie Nukleinsäurefragmente, die z.B. zur Verwendung als Hybridisierungssonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung von erfindungsgemäßen kodierenden Nukleinsäuren verwendet werden können.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem untranslatierte Sequenzen vom 3'- und/oder 5'-Ende des kodierenden Genbereichs enthalten.

Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül kann mittels molekularbiologischer Standard-Techniken und der erfindungsgemäß bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Beispielsweise kann cDNA aus einer geeigneten cDNA-Bank isoliert werden, indem eine der konkret offenbarten vollständigen Sequenzen oder ein Abschnitt davon als Hybridisierungssonde und Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies läßt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine der offenbarten Sequenzen oder einen

Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei die Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz erstellt wurden, verwendet werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und durch DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide, die einer ST-Nukleotidsequenz entsprechen, können ferner durch Standard-Syntheseverfahren, z.B. mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementären Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

Die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung homologer Sequenzen in anderen Zelltypen und Organismen verwendbar sind. Solche Sonden bzw. Primer umfassen gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B. etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges hybridisiert.

Weitere erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO: 1, 3, 5 und 7 und unterscheiden sich davon durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide, kodieren aber weiterhin für Polypeptide mit dem gewünschten Eigenschaftsprofil.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten oder Allelvarianten, davon. Gegenstand sind ebenso durch konservative Nukleotidsubstitutionen (d.h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhältliche Sequenzen.

Gegenstand der Erfindung sind auch die durch Sequenzpolymorphismen von den konkret offenbarten Nukleinsäuren abgeleiteten Moleküle. Diese genetischen Polymorphismen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund der natürlichen Variation existieren. Diese natürlichen Variationen bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz eines Gens.

Weiterhin umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuresequenzen, welchen mit oben genannten kodierenden Sequenzen hybridisieren oder dazu komplementär sind. Diese Polynukleotide lassen sich bei Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Banken auffinden und gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren. Eine weitere Möglichkeit bietet die Transformation geeigneter Mikroorganismen mit erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder Vektoren, die Vermehrung der Mikroorganismen und damit der Polynukleotide und deren anschließende Isolierung. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Polynukleotide auch auf chemischem Wege synthetisiert werden.

Unter der Eigenschaft, an Polynukleotide „hybridisieren" zu können, versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen zu 70-100%, vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze. Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt. Unter stringenten Bedingungen versteht man beispielsweise in der Northern-Blot-Technik die Verwendung einer 50 – 70 °C, vorzugsweise 60 – 65 °C warmen Waschlösung, beispielsweise 0,1x SSC-Puffer mit 0,1% SDS (20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0) zur Elution unspezifisch hybridisierter cDNA-Sonden oder Oligonukleotide. Dabei bleiben, wie oben erwähnt, nur in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander gebunden. Die Einstellung stringenter Bedingungen ist dem Fachmann bekannt und ist z.B. in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft "Antisense-"Nukleinsäuren. Diese umfaßt eine Nukleotidsequenz, die zu einer kodierenden "Sense-"Nukleinsäure, komplementär ist. Die Antisense-Nukleinsäure kann zum gesamten kodierenden Strang oder nur zu einem Abschnitt davon komplementär sein. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Antisense-Nukleinsäuremolekül antisense zu einem nicht-kodierenden Bereich des kodierenden Stranges einer Nukleotidsequenz. Der Begriff "nicht-kodierender Bereich" betrifft die als 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche bezeichneten Sequenzabschnitte.

Ein Antisense-Oligonukleotid kann bspw. etwa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide lang sein. Eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure kann durch chemische Synthese und enzymatische Ligationsreaktionen mittels im Fachgebiet bekannter Verfahren konstruiert

werden. Eine Antisense-Nukleinsäure kann chemisch synthetisiert werden, wobei natürlich vorkommende Nukleotide oder verschieden modifizierte Nukleotide verwendet werden, die so gestaltet sind, daß sie die biologische Stabilität der Moleküle erhöhen, oder die physikalische Stabilität des Duplexes erhöhen, der zwischen der Antisense- und Sense-Nukleinsäure entstanden ist. Beispielsweise können Phosphorthioat-Derivate und acridinsubstituierte Nukleotide verwendet werden. Beispiele modifizierter Nukleoside, die zur Erzeugung der Antisense-Nukleinsäure verwendet werden können, sind u.a. 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chloruracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, Beta-D-Galactosylqueosin, Inosin, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, Beta-D-Mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentenyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure (v), Wybutoxosin, Pseudouracil, Queosin, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure (v), 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil, (acp3)w und 2,6-Diaminopurin. Die Antisense-Nukleinsäure kann auch biologisch hergestellt werden, indem ein Expressionsvektor verwendet wird, in den eine Nukleinsäure in Antisense-Richtung subkloniert worden ist.

Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuremoleküle werden üblicherweise an eine Zelle verabreicht oder in situ erzeugt, so daß sie mit der zellulären mRNA und/oder einer kodierenden DNA hybridisieren oder daran binden, so daß die Expression des Proteins, z.B. durch Hemmung der Transkription und/oder Translation, gehemmt wird.

Das Antisense-Molekül kann so modifiziert werden, daß es spezifisch an einen Rezeptor oder an ein Antigen bindet, das auf einer ausgewählten Zelloberfläche exprimiert wird, z.B. durch Verknüpfen des Antisense-Nukleinsäuremoleküls mit einem Peptid oder einem Antikörper, das/der an einen Zelloberflächenrezeptor oder Antigen bindet. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann auch unter Verwendung der hier beschriebenen Vektoren an Zellen verabreicht werden. Zur Erzielung hinreichender intrazellulärer Konzentrationen der Antisense-Moleküle sind Vektorkonstrukte, in denen sich das Antisense-Nukleinsäuremolekül unter der Kontrolle eines starken bakteriellen, viralen oder eukaryotischen Promotors befindet, bevorzugt.

In einer weiteren Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuremolekül ein alpha-anomeres Nukleinsäuremolekül. Ein alpha-anomeres Nukleinsäuremolekül bildet spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA, wobei die Stränge im Gegensatz zu

gewöhnlichen alpha-Einheiten parallel zueinander verlaufen. (Gaultier et al., (1987) Nucleic Acids Res. 15:6625-6641). Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann zudem ein 2'-O-Methylribonukleotid (Inoue et al., (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) oder ein chimäres RNA-DNA-Analogon (Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215:327-330) umfassen.

Gegenstand der Erfindung sind auch Ribozyme. Dies sind katalytische RNA-Moleküle mit Ribonukleaseaktivität, die eine einzelsträngige Nukleinsäure, wie eine mRNA, zu der sie einen komplementären Bereich haben, spalten können. Somit können Ribozyme (z.B. Hammerhead-Ribozyme (beschrieben in Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591)) zur katalytischen Spaltung von erfindungsgemäßen Transkripten verwendet werden, um dadurch die Translation der entsprechenden Nukleinsäure zu hemmen. Ein Ribozym mit Spezifität für eine erfindungsgemäße kodierende Nukleinsäure kann z.B. auf der Basis einer hierin konkret offenbarten cDNA gebildet werden. Beispielsweise kann ein Derivat einer Tetrahymena-L-19-IVS-RNA konstruiert werden, wobei die Nukleotidsequenz der aktiven Stelle komplementär zur Nukleotidsequenz ist, die in einer erfindungsgemäßen kodierenden mRNA gespalten werden soll. (vgl. z.B. US-A-4 987 071 und US-A-5 116 742). Alternativ kann mRNA zur Selektion einer katalytischen RNA mit spezifischer Ribonukleaseaktivität aus einem Pool von RNA-Molekülen verwendet werden (siehe z.B. Bartel, D., und Szostak, J.W. (1993) Science 261:1411-1418).

Die Genexpression erfindungsgemäßer Sequenzen läßt sich alternativ hemmen, indem Nukleotidsequenzen, die komplementär zum regulatorischen Bereich einer erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz sind (z.B. zu einem Promotor und/oder Enhancer einer kodierenden Sequenz) so dirigiert werden, daß Triple-Helixstrukturen gebildet werden, die die Transkription des entsprechenden Gens in Ziel-Zellen verhindern (Helene, C. (1991) Anticancer Drug Res. 6(6) 569-584; Helene, C. et al., (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:27-36; und Maher. L.J. (1992) Bioassays 14(12):807-815).

Expressionskonstrukte und Vektoren:

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte. Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz. Unter einer „operativen Verknüpfung" versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebe-

nenfalls weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen. Geeignete regulatorische Sequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Beispiele für brauchbare Promotoren sind: cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, laclq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ-PR- oder im λ-PL-Promotor, die vorteilhafterweise in gramnegativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren amy und SPO2, die Hefepromotoren ADC1, MFα , AC, P-60, CYC1, GAPDH oder die Pflanzenpromotoren CaMV/35S, SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, not oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduztierbarer Promotoren, wie der P_rP_l-Promotor. Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber

auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Als Beispiele für geeignete Expressionsvektoren können genannt werden:

Übliche Fusionsexpressionsvektoren, wie pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

Nicht-Fusionsprotein-Expressionsvektoren wie pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315) und pET 11d (Studier et al. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89).

Hefe-Expressionsvektor zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* , wie pYepSec1 (Baldari et al., 1987) Embo J. 6:229-234), pMFα (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen

Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", in: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol.. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39).

Pflanzen-Expressionsvektoren, wie solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721.

Säugetier-Expressionsvektoren, wie pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) und pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195).

Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryontische und eukaryotische Zellen sind in Kapitel 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

Rekombinante Mikroorganismen:

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert sind und zur Produktion der erfindungsgemäßen Polypeptide eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, oder Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

Erfindungsgemäß sind auch homolog rekombinierten Mikroorganismen herstellbar. Dazu wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines erfindungsgemäßen Gens oder einer kodierenden Sequenz enthält, worin gegebenenfalls wenigstens eine Aminosäure-Deletion, -Addition oder -Substitution eingebracht worden ist, um die erfindungsgemäße Sequenz zu verändern, z.B. funktionell zu disrumpieren ("Knockout"-Vektor). Die eingebrachte Sequenz kann z.B. auch ein Homologes aus einem Verwandten Mikroorganismus sein oder aus einer Säugetier-, Hefe- oder Insektenquelle abgeleitet sein. Der zur homologen Rekombination verwendete Vektor kann alternativ derart ausgestaltet sein, daß das endogene Gen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert ist, jedoch noch das funktionelle Protein codiert (z.B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich derart verändert sein, daß dadurch die Expression des endogenen Proteins verändert wird). Der veränderte Abschnitt des ST-Gens ist im homologen Rekombinationsvektor. Die Konstruktion geeigneter Vektoren zur homologen Rekombination ist z.B. beschrieben in Thomas, K.R. und Capecchi, M.R. (1987) Cell 51:503.

Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen Escherichia, wie z. B. Escherichia coli, Streptomyces, Bacillus oder Pseudomonas, eukaryotische Mikroorganismen, wie Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen. Bevorzugte Organismen sind aus der Gattung Ashbya, insbesondere aus A. gossypii-Stämmen ausgewählt.

Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden. Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen λ oder μ oder andere temperente Phagen oder

Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem. Beispielsweise ist unter dem Begriff "Expressionssystem" die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen, und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, wie insbesondere Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden.

Rekombinante Herstellung der Polypeptide:

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung einer erfindungsgemäßen Polypeptide oder funktioneller, biologisch aktiver Fragmente davon, wobei man einen Polypeptide-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Polypeptide induziert und diese aus der Kultur isoliert. Die Polypeptide können so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist.

Der rekombinante Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

Die Zellen werden dann, falls die Polypeptide nicht in das Kulturmedium sezerniert werden, aufgeschlossen und das Produkt nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z.B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

Eine Aufreinigung der Polypeptide kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, T . G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

Besonders vorteilhaft ist es, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nucleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die z.B. einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z.B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z.B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur mikrobiologischen Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon.

Wird die Umsetzung mit einem rekombinanten Mikroorganismus durchgeführt, so erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z.B. bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 20 °C oder mehr, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Um die Reaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren Promotors. Die Kultivierung wird nach Induktion der Vitamin B2-Produktion in Gegenwart von Sauerstoff 12 Stunden bis 3 Tage fortgesetzt.

Folgende nichtlimitierende Beispiele beschreiben spezielle Ausführungsformen der Erfindung.

Allgemeine experimentelle Angaben

a) Allgemeine Klonierungsverfahren

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von

Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) a.a.O. beschrieben durchgeführt.

b) Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR wurde nach Standardprotokoll mit folgendem Standardansatz durchgeführt:

8 µl dNTP-Mix (200µM), 10 µl Taq-Polymerase-Puffer (10 x) ohne $MgCl_2$, 8µl $MgCl_2$ (25mM), je 1 µl Primer (0,1 µM), 1µl zu amplifizierende DNA, 2,5 U Taq-Polymerase (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen), ad 100 µl demineralisiertes Wasser.

c) Kultivierung von E.coli

Die Kultivierung von rekombinanten E. coli-Stämme DH5α wurde in LB-Amp Medium (Trypton 10,0g, NaCl 5,0 g, Hefeextrakt 5,0 g, Ampicillin 100 g/ml H_20 ad 1000 ml) bei 37 °C kultiviert. Dazu wurde jeweils eine Kolonie mittels Impföse von einer Agarplatte in 5 ml LB-Amp überführt. Nach ca. 18 h Stunden Kultivierung bei einer Schüttelfrequenz von 220 Upm wurden 400 ml Medium in einem 2-l-Kolben mit 4 ml Kultur inokuliert. Die Induktion der P450-Expression in E. coli erfolgte nach Erreichen eines OD578-Wertes zwischen 0,8 und 1,0 durch eine drei- bis vierstündige Hitzeschockinduktion bei 42 °C.

d) Reinigung des gewünschten Produktes aus der Kultur

Die Gewinnung des gewünschten Produktes aus dem Mikroorganismus oder aus dem Kulturüberstand kann durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen. Wird das gewünschte Produkt von den Zellen nicht sezerniert, können die Zellen aus der Kultur durch langsame Zentrifugation geerntet werden, die Zellen können durch Standard-Techniken, wie mechanische Kraft oder Ultraschallbehandlung, lysiert werden.

Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation entfernt, und die Überstandsfraktion, die die löslichen Proteine enthält, wird zur weiteren Reinigung der gewünschten Verbindung erhalten. Wird das Produkt von den Zellen sezerniert, werden die Zellen durch langsame Zentrifugation aus der Kultur entfernt, und die Überstandsfraktion wird zur weiteren Reinigung behalten.

Die Überstandsfraktion aus beiden Reinigungsverfahren wird einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Molekül mit höherer Selektivität als die Verunreinigungen entweder auf dem Chromatographieharz zurückgehalten wird oder dieses passiert. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes zu reinigendes Molekül bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

Im Stand der Technik sind viele Reinigungsverfahren bekannt. Diese Reinigungstechniken sind z.B. beschrieben in Bailey, J.E. & Ollis, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill: New York (1986).

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindungen kann durch Techniken des Standes der Technik bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

e) Allgemeine Beschreibung der MPSS-Methode, Klonidentifizierung und Homologiesuche

Die MPSS Technologie (**M**assive **P**arallele **S**ignatur **S**equenzierung, wie von Brenner et al, Nat. Biotechnol.(2000) 18, 630-634 beschrieben; worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird) wurde an dem filamentösen, Vitamin B2 produzierenden Pilz *Ashbya gossypii* angewendet. Mit Hilfe dieser Technologie ist es möglich, mit hoher Genauigkeit quantitative Aussagen über die Expressionsstärke einer Vielzahl von Genen in einem eukaryotischen Organismus zu erhalten. Dabei wird die mRNA des Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt X isoliert, mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend in spezielle Vektoren kloniert, die eine spezifische Tag-Sequenz besitzen. Die Anzahl von Vektoren mit unterschiedli-

cher Tagsequenz wird dabei so hoch gewählt (etwa 1000-fach höher), daß statistisch gesehen, jedes DNA-Molekül in einen, durch seine Tag-Sequenz einzigartigen, Vektor kloniert wird.

Anschließend werden die Vektorinserts zusammen mit dem Tag herausgeschnitten. Die so erhaltenen DNA-Moleküle werden dann mit Mikrokügelchen inkubiert, die die molekularen Gegenstücke zu den erwähnten Tags besitzen. Nach Inkubation kann davon ausgegangen werden, daß jedes Mikrokügelchen über die spezifischen Tags bzw. Gegenstücke mit nur einer Sorte von DNA Molekülen beladen ist. Die Kügelchen werden in eine spezielle Flußzelle überführt und dort fixiert, so daß es möglich ist, mit Hilfe eines adaptierten Sequenzierverfahrens, auf Basis von Fluoreszensfarbstoffen und mit Hilfe einer digitalen Farbkamera, eine Massensequenzierung aller Kügelchen vorzunehmen. Mit dieser Methode ist zwar eine zahlenmäßig hohe Auswertung möglich, die allerdings durch eine Leseweite von etwa 16 bis 20 Basenpaaren limitiert ist. Die Sequenzlänge reicht dennoch aus, um bei den meisten Organismen eine eindeutige Zuordnung zwischen Sequenz und Gen zu ermöglichen (20bp besitzen eine Sequenzhäufigkeit von ~$1x10^{12}$, das menschliche Genom besitzt im Vergleich dazu "nur" eine Größe von ~$3x10^{9}$ bp).

Die auf diese Weise erhaltenen Daten werden ausgewertet, indem die Anzahl der gleichen Sequenzen gezählt und ihre Häufigkeiten miteinander verglichen werden. Häufig auftretende Sequenzen spiegeln eine hohe Expressionsstärke, vereinzelt auftretende Sequenzen eine niedrige Expressionsstärke wider. Erfolgte die mRNA-Isolation zu zwei Unterschiedlichen Zeitpunkten (X und Y), so ist es möglich ein zeitliches Expressionsmuster einzelner Gene aufzustellen.

Beispiel 1:

Isolation von mRNA aus *Ashbya gossypii*

Ashbya gossypii wurde in an sich bekannter Weise kultiviert (Nährmedium: 27,5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l Magnesiumsulfat; 50ml/l Sojaöl; pH 7). Myzelproben von *Ashbya gossypii* werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Fermentation (24h, 48h und 72h) entnommen und die entsprechende RNA bzw. mRNA wird nach dem Protokoll von Sambrook et al. (1989) daraus isoliert.

Beispiel 2:

Anwendung der MPSS

Isolierte mRNA von *A. gossypii* wird dann einer MPSS-Analyse, wie oben erläutert, unterzogen.

Die ermittelten Datensätze werden einer statistischen Auswertung unterzogen und nach Signifikanz der Expressionsunterschiede gegliedert. Dabei wurde sowohl hinsichtlich Erhöhung bzw. Erniedrigung der Expressionsstärke untersucht. Eine Einteilung erfolgt über eine Einstufung der Expressionsveränderung in a) monotone Veränderung, b) Veränderung nach 24h, und c) Veränderung nach 48h.

Die eine Expressionsveränderung repräsentierenden durch MPSS-Analyse ermittelten 20bp-Sequenzen werden dann als Sonden verwendet und gegen eine Genbank von *Ashbya gossypii*, mit einer durchschnittlichen Insertgröße von etwa 1kb, hybridisiert. Die Hydridisierungstemperatur lag dabei im Bereich von etwa 30 bis 57°C.

Beispiel 3:
Erstellung einer genomischen Genbank aus *Ashbya gossypii*

Zur Erstellung einer genomischen DNA-Bank wird zunächst chromosomale DNA nach der Methode von Wright und Philippsen (Gene (1991) 109: 99-105) und Mohr (1995, PhD Thesis, Biozentrum Universität Basel, Schweiz) isoliert.

Die DNA wird partiell mit Sau3A verdaut. Dazu werden 6µg genomische DNA einem Sau3A Verdau mit unterschiedlichen Enzymmengen (0,1 bis 1 U) unterzogen. Die Fragmente werden in einem Saccharose-Dichtegradienten fraktioniert. Die 1kb Region wird isoliert und einer QiaEx-Extraktion unterzogen. Die größten Fragmente werden mit dem BamHI geschnittenen Vektor pRS416 (Sikorski und Hieter, Genetics (1988) 122; 19-27) ligiert (90 ng BamHI geschnittener, dephosphorylierter Vektor; 198 ng Insert DNA; 5ml Wasser; 2 µl 10xLigationspuffer; 1U Ligase). Mit diesem Ligationsansatz wird *E. coli* Laborstamm XL-1 blue transformiert und die resultierenden Klone werden zur Identifizierung des Inserts eingesetzt.

Beispiel 4:
Herstellung einer geordneten Genbank (CHIP-Technologie)

Etwa 25,000 Kolonien der *Ashbya gossypii* Genbank (dies entspricht einer etwa 3-fachen Genomabdeckung) wurden geordnet auf eine Nylonmembran transferiert und anschließend nach der Methode der Koloniehybridisierung wie in Sambrook et al. (1989) beschrieben, behandelt. Von den durch MPSS-Analyse ermittelten 20bp-Sequenzen wurden Oligonukleotide synthetisiert und mit Hilfe von ^{32}P radioaktiv markiert. Jeweils 10 markierte Oligonukleotide mit ähnlichem

Schmelzpunkt werden vereinigt und gemeinsam gegen die Nylonmembranen hybridisiert. Nach Hybridisierungs- und Waschschritten werden positive Klone durch Autoradiographie identifiziert, und mit Hilfe von PCR-Sequenzierung direkt analysiert.

Auf diese Weise wurde ein Klon identifiziert, der ein Insert mit der internen Bezeichnung „Oligo 55" trägt und mit dem MIPS Tag „INP54" aus *S. cerevisiae* signifikante Homologien besitzt. Das Insert besitzt eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1.

Auf diese Weise wurde weiterhin ein Klon identifiziert, der ein Insert mit der internen Bezeichnung „Oligo 176" trägt und mit dem MIPS Tag „Ybr025c" aus *S. cerevisiae* signifikante Homologien besitzt. Das Insert besitzt eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 5.

Beispiel 5:
Auswertung der Sequenzdaten mit Hilfe einer BLASTX Suche

Eine Auswertung der erhaltenen Nukleinsäure-Sequenzen, d.h. deren funktionale Zuordnung zu einer funktionalen Aminosäuresequenz, erfolgte mittels einer BLASTX-Suche in Sequenz-Datenbanken. Fast alle der aufgefundenen Aminosäuresequenz-Homologien betrafen *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe). Da dieser Organismus bereits vollständig sequenziert worden ist, konnten genauere Informationen bezüglich dieser Gene unter:
http://mips.gsf.de/proj/yeast/search/code_search.htm nachgeschlagen werden.

So wurden folgende Homologien mit einem Aminosäurefragment aus *S. cerevisiae* ermittelt. Die entsprechenden Alignments sind in den beiliegenden Figuren 1 und 2 gezeigt.

a) Die vom korrespondierenden Gegenstrang zu SEQ ID NO:1 abgeleitete Aminosäuresequenz besitzt signifikante Sequenzhomologie mit einer Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase aus S. cerevisiae. Eine davon abgeleiteten Aminosäure-Teilsequenz (entsprechend dem Gegenstrang zu den Nucleotiden 1209 bis 964 aus SEQ ID NO:1) mit einer Teilsequenz des S. cerevisiae Enzyms ist in Figur 1 dargestellt. SEQ ID NO: 2 zeigt eine N-terminal verlängerte Aminosäure-Teilsequenz .

Die ermittelte A. gossypii Nukleinsäuresequenz konnte damit die Funktion einer Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase zugeordnet werden.

b) Die vom korrespondierenden Gegenstrang zu SEQ ID NO:5 abgeleitete Aminosäuresequenz besitzt signifikante Sequenzhomologie mit einem Protein mit einer starken Ähnlichkeit zum Ylf1p/ATP/GTP-Bindungsstellenmotiv A (P-Loop) aus S. cerevisiae. Eine davon abgeleiteten Aminosäure-Teilsequenz (entsprechend den Nucleotiden 507 bis 1 aus SEQ ID NO:5) mit einer Teilsequenz des S. cerevisiae Proteins ist in Figur 2 dargestellt. SEQ ID NO: 6 zeigt eine N-terminal verlängerte Aminosäure-Teilsequenz .

Die ermittelte A. gossypii Nukleinsäuresequenz konnte damit der Funktion eines Proteins mit einer starken Ähnlichkeit zum Ylf1p/ATP/GTP-Bindungsstellenmotiv A (P-Loop) zugeordnet werden.

Beispiel 6:

Isolierung der Full-Length-DNA

a) Konstruktion einer *A. gossypii*-Genbank

Hochmolekulare zelluläre Gesamt-DNA von *A. gossypii* wurde aus einer 2 Tage alten, in einem flüssigen MA2-Medium (10g Glucose, 10g Pepton, 1g Hefeextrakt, 0,3g Myo-Inosit ad 1000 ml) gewachsenen 100 ml Kultur hergestellt. Das Myzel wurde abfiltriert, zweimal mit H_2O dest. gewaschen, in 10 ml 1M Sorbitol, 20 mM EDTA, enthaltend 20 mg Zymolyase-20T, suspendiert und 30 bis 60 min unter leichtem Schütteln bei 27 °C inkubiert. Die Protoplasten-Suspension wurde auf 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 100 mM EDTA und 0,5-%igem Natriumdodecylsulfat (SDS) eingestellt und 20 min bei 65 °C inkubiert. Nach zwei Extraktionen mit Phenol-Chloroform (1:1 vol/vol) wurde die DNA mit Isopropanol gefällt, in TE-Puffer suspendiert, mit RNase behandelt, erneut mit Isopropanol gefällt und in TE resuspendiert.

Eine *A. gossypii*-Kosmid-Genbank wurde hergestellt, indem man nach der Größe ausgewählte, mit *Sau3A* teilverdaute genomische DNA an die dephosphorylierten Arme des Cosmidvektors Super-Cos1 (Stratagene) band. Der Super-Cos1-Vektor wurde zwischen den beiden *cos*-Stellen durch Verdau mit *XbaI* und Dephosphorylierung mit alkalischer Kalbsdarm-Phosphatase (Boehringer) geöffnet, gefolgt von einem Öffnen der Klonierungsstelle mit *Bam*HI. Die Ligationen wurden über Nacht bei 15 °C in 20 µl, enthaltend 2,5 µg teilverdauter chromosomaler DNA, 1 µg Super-Cos1-Vektorenarme, 40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 1mM Dithiothreitol, 0,5 mM ATP und 2 Weiss-Einheiten T4-DNA-Ligase (Boehringer) durchgeführt. Die Ligationsprodukte wurden unter Verwendung der Extrakte und des Protokolls von Stratagene (Gigapack II Packaging Extract) in vitro verpackt. Das verpackte Material wurde zur Infizierung von *E. coli* NM554

(*recA13, araD139, Δ(ara,leu)7696, Δ(lac)17A, galU, galK, hsrR, rps(str^r), mcrA, mcrB*) verwendet und auf Ampicillin (50 µg/ml) enthaltende LB-Platten verteilt. Man erhielt Transformanten, welche ein *A. gossypii*-Insert einer durchschnittlichen Länge von 30-45 kb enthielten.

b) Lagerung und Screening der Cosmid-Genbank

Insgesamt 4 x 10^4 frische Einzelkolonien wurden einzeln in Vertiefungen von 96-er Microtiterplatten (Falcon, Nr. 3072) in 100 µl LB-Medium, ergänzt mit dem Gefriermedium (36 mM K_2HPO_4/13,2 mM KH_2PO_4, 1,7 mM Natriumcitrat, 0,4 mM $MgSO_4$, 6,8 mM $(NH_4)_2SO_4$, 4,4% (wt/vol) Glycerin) und Ampicillin (50 µg/ml), inokuliert, über Nacht bei 37 °C unter Schütteln wachsen gelassen und bei –70 °C eingefroren. Die Platten wurden rasch aufgetaut und danach unter Verwendung eines 96-er-Replikators, der in einem Ethanolbad unter anschließender Verdunstung des Ethanols auf einer heißen Platte sterilisiert worden war, in frisches Medium dupliziert. Vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen (vor irgendwelchen anderen Maßnahmen) wurden die Platten kurz in einem Mikrotiterschüttler (Infors) geschüttelt, um eine homogene Zellsuspension zu gewährleisten. Mittels eines Robotersystems (Bio-Robotics), mit dem geringe Mengen an Flüssigkeit aus 96 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte auf Nylonmembran (GeneScreen *Plus*, New England Nuclear) transferiert werden können, wurden einzelne Klone auf Nylonmembranen platziert. Nach dem Transfer der Kultur aus den 96-er Mikrotiterplatten (1920 Klone) wurden die Membranen auf die Oberfläche von LB-Agar mit Ampicillin (50 µg/ml) in 22 x 22 cm Kulturschalen (Nunc) platziert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Vor Erreichen der Zellkonfluenz wurden die Membranen, wie von Herrmann, B. G., Barlow, D. P. und Lehrach, H. (1987) in Cell 48, S. 813-825 beschrieben, prozessiert, wobei als zusätzliche Behandlung nach dem ersten Denaturierungsschritt ein 5-minütiges Bedampfen der Filter auf einem in Denaturierungslösung getränkten Pad über einem kochenden Wasserbad hinzukommt.

Hit Hilfe des Random-Hexamer-Primer-Verfahrens (Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983), Anal. Biochem. 132, S. 6-13) wurden doppelsträngige Sonden durch Aufnahme von [alpha-^{32}P]dCTP mit hoher spezifischer Aktivität markiert. Die Membranen wurden prähybridisiert und 6 bis 12 h bei 42 °C in 50% (vol/vol) Formamid, 600 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 1 mM EDTA, 10% Dextransulfat, 1% SDS, und 10x Denhardt-Lösung, enthaltend Lachssperma-DNA (50 µg/ml) mit ^{32}P-markierten Sonden (0,5-1 x 10^6cpm/ml) hybridisiert. Typischerweise wurden Waschschritte etwa 1 h bei 55 bis 65 °C in 13 bis 30 mM NaCl, 1,5 bis 3 mM Natriumcitrat, pH 6,3, 0,1 % SDS durchgeführt und die Filter wurden 12 bis 24 h bei –70 °C mit Kodak-Verstärkerplatten autoradiographiert. Bislang wurden einzelne Membrane mehr als 20 mal erfolgreich wiederverwendet. Zwischen den Autoradiographien wurden die Filter durch Inkubation bei 95 °C für 2 x 20 min in 2 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,2 mM EDTA, 0,1 % SDS gestrippt.

c) Zurückgewinnung positiver Kolonien aus der aufbewahrten Genbank

Gefrorene Bakterienkulturen in Microtiter-Wells wurden unter Verwendung steriler Einweg-Lanzetten abgekratzt und das Material wurde auf LB-Agar-Petrischalen enthaltend Ampicillin (50 µg/ml) ausgestrichen. Einzelne Kolonien wurden danach zur Inokulierung von Flüssigkulturen für Herstellung von DNA mittels Alkali-Lyse-Verfahren (Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979), Nucleic Acids Res. 7, S. 1513-1523) verwendet.

d) Full-Length DNA

Auf die oben beschriebenen Weise konnten Klone identifiziert werden, der ein Insert mit der entsprechenden Vollsequenz tragen. Diese Klone tragen die internen Bezeichnungen „Oligo 55v" und „Oligo 176v". Die die Vollsequenz umfassenden Inserts besitzen eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 3 bzw.7. Eine Übersicht über sämtliche erfindungsgemäße Teil- und Vollsequenzen ist in folgender Tabelle 1 zu finden:

Tabelle 1: Sequenzübersicht

SEQ ID NO:	Oligo	Beschreibung der Sequenz	Sequenzhomologie
1	055	DNA-Teilsequenz	Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase aus S. cerevisiae.
2	055	Aminosäureteilsequenz, abgeleitet vom Gegenstrang zu SEQ ID NO: 1	
3	055	DNA-Full-lenght-Sequenz	
4	055	Aminosäuresequenz, entsprechend dem kodierenden Bereich der SEQ ID NO: 3 von Position 557 bis 958	
5	176	DNA-Teilsequenz	ein Protein mit ATP und/oder GTP Bindungsaktivität aus S. cerevisiae
6	176	Aminosäureteilsequenz, abgeleitet vom Gegenstrang zu SEQ ID NO: 5	
7	176	DNA-Full-lenght-Sequenz	
8	176	Aminosäuresequenz, entsprechend dem kodierenden Bereich der SEQ ID NO: 5 von Position 1234 bis 2412	

Patentansprüche

1. Polynukleotid, welches für ein Protein aus Ashbya gossypii isolierbar ist und für ein Protein kodiert, das mit der Signaltransduktion assoziiert ist.

2. Polynukleotid nach Anspruch 1, welches für ein Protein aus Ashbya gossypii isolierbar ist und für ein Protein kodiert, das mit der Signaltransduktion assoziiert ist und ausgewählt ist unter einer Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase und einem Protein mit ATP und/oder GTP Bindungsaktivität.

3. Polynukleotid nach Anspruch 1 oder 2, umfassend eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 5, welche vorzugsweise aus *Ashbya gossypii* isolierbar ist; das dazu komplementäre Polynukleotid; und die von diesen Polynukleotiden durch Entartung des genetischen Codes abgeleiteten Sequenzen.

4. Polynukleotid nach Anspruch 3, welches eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 3 oder 7 oder ein Fragment davon umfasst.

5. Oligonukleotid, welches mit einem Polynukleotid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, insbesondere unter stringenten Bedingungen, hybridisiert.

6. Polynukleotid, welches mit einem Oligonukleotid nach Anspruch 5, insbesondere unter stringenten Bedingungen, hybridisiert und für ein Genprodukt aus Mikroorganismen der Gattung *Ashbya* oder ein funktionales Äquivalent dieses Genproduktes kodiert.

7. Polypeptid, welches von einem Polynukleotid kodiert wird, das die Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 bis 4 oder ein Fragment davon umfasst, oder von einem Polynukleotid nach Anspruch 6 kodiert wird; oder welches eine Aminosäuresequenz aufweist, die wenigstens 10 zusammenhängende Aminosäurereste gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6 oder 8 umfasst; sowie funktionale Äquivalente davon, insbesondere solche, welche eine der in Anspruch 2 definierten Aktivitäten besitzen.

8. Expressionskassette, umfassend in operativer Verknüpfung mit wenigstens einer regulativen Nukleinsäuresequenz eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 6.

9. Rekombinanter Vektor, umfassend wenigstens eine Expressionskassette nach Anspruch 8.

10. Prokaryotischer oder eukaryotischer Wirt, transformiert mit wenigstens einem Vektor nach Anspruch 9.

11. Prokaryotischer oder eukaryotischer Wirt, in welchem die funktionale Expression wenigstens eines Gens moduliert ist, das für ein Polypeptid nach Anspruch 7 kodiert; oder in welchem die biologische Aktivität eines Polypeptids nach Anspruch 7 erniedrigt oder erhöht ist.

12. Wirt nach Anspruch 10 oder 11 aus der Gattung *Ashbya*.

13. Verwendung einer Expressionskassette nach Anspruch 8, eines Vektors nach Anspruch 9 oder eines Wirts nach einem der Ansprüche 10 bis 12 zur mikrobiologischen Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon.

14. Verwendung einer Expressionskassette nach Anspruch 8, eines Vektors nach Anspruch 9 oder eines Wirts nach einem der Ansprüche 10 bis 12 zur rekombinanten Herstellung eines Polypeptids nach Anspruch 7.

15. Verfahren zum Nachweis eines Effektortargets für die Modulation der mikrobiologischen Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon, wobei man einen Mikroorganismus, der zur mikrobiologischen Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon befähigt ist, mit einem Effektor behandelt, welcher mit einem Target, ausgewählt unter einem Polypeptid nach Anspruch 7 oder einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz, wechselwirkt, insbesondere bindet, den Einfluß des Effektors auf die Menge des mikrobiologisch produzierten Vitamins B2, und/oder des Präkursors und/oder eines Derivats davon validiert; und das Target gegebenenfalls isoliert.

16. Verfahren zur Modulation der mikrobiologischen Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon, wobei man einen Mikroorganismus, der zur mikrobiologischen Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder

Derivaten davon befähigt ist, mit einem Effektor behandelt, welcher mit einem Target, ausgewählt unter einem Polypeptid nach Anspruch 7 oder einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz, wechselwirkt.

17. Effektor für ein Target, ausgewählt unter einem Polypeptid nach Anspruch 7 oder einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz, wobei der Effektor ausgewählt ist unter:

a) Antikörpern oder antigenbindenen Fragmenten davon;

b) von a) verschiedenen Polypeptid-Liganden, welche mit dem Polypeptid gemäß Anspruch 7 wechselwirken;

c) niedermolekularen Effektoren, welche die biologische Aktivität eines Polypeptids nach Anspruch 7 modulieren;

d) Antisense-Nukleinsäuresequenzen.

18. Verfahren zur mikrobiologischen Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon, wobei man einen Wirt nach einem der Ansprüche 10 bis 12 unter die Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon begünstigenden Bedingungen kultiviert und das(die) gewünschte(n) Produkt(e) aus dem Kulturansatz isoliert.

19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei man vor und/oder während der Kultivierung des Wirts diesen mit einem Effektor nach Anspruch 17 behandelt.

20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, wobei der Wirt ausgewählt ist unter Mikroorganismen der Gattung *Ashbya*.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei der Mikroorganismus ein Wirt nach einem der Ansprüche 10 bis 12 ist.

22. Verwendung eines Polynukleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und 6 oder eines Polypeptids nach Anspruch 7 als Target zur Modulation der Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon in einem Mikroorganismus der Gattung *Ashbya*.

23. Verwendung eines Polynukleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und 6 oder eines Polypeptids nach Anspruch 7 als Target zur Modulation des Zellwand- und

Cytoskelettaufbaus in einem Mikroorganismus der Gattung *Ashbya* während der Kultivierung zur mikrobiologischen Produktion von Vitamin B2 und/oder Präkursoren und/oder Derivaten davon.

24. Wirt nach Anspruch 12 mit verbesserter Signaltransduktion, insbesondere verbesserter Zellantwort auf extrazelluläre Signale.

Fig. 1

Oligo 55

```
443 FRISLTTSNCAKQIPLGSNDYLLQRAIF--ERLLSAGVDYDLYAIGFQELLPIWDASCPL 270
    +++S+TT NC K+ P+ ++  ++++ +F  +  +S     DLY +GFQE++PIW  S P
6   WKVSVTTFNCGKEFPVENSKAIVKQLLFPYDDGISQLELQDLYVLGFQEVVPIWQGSFPA 65

269 QTKSCLRRLVPVILQRLNSGVEDT 198        A. gossypii
     +  + R+    +  LN  V  T
66  VNRDLIDRITTTAVNCLNEKVSAT 89         S. cerevisiae
```

Fig. 2

Oligo 176

```
507 MPPKKQVEEKKVLLGRPGNNLKAGIVGLANVGKSTFFQAITRCPLGNPANYPFATIDPEE 328
    MPPKKQVEEKKVLLGRPGNNLKAGIVGLANVGKSTFFQAITRCPLGNPANYPFATIDPEE
1   MPPKKQVEEKKVLLGRPGNNLKAGIVGLANVGKSTFFQAITRCPLGNPANYPFATIDPEE 60

327 ARVIVPSPRFDSLCDVYKP-ASKVPAHLTVYDIAGLTKGASKGEGLGNAFLSHIRSVDSI 151
    ARVIVPSPRFD LC++YK  AS+VPAHLTVYDIAGLTKGAS GEGLGNAFLSHIRSVDSI
61  ARVIVPSPRFDKLCEIYKKTASEVPAHLTVYDIAGLTKGASAGEGLGNAFLSHIRSVDSI 120

150 YQVVRCFDDAEIIHIEGDVDPVRDLDIINTELRLKDIEFAEKHLEAVEKI 1       A. gossypii
    YQVVRCFDDAEIIH+EGDVDPVRDL+IIN ELRLKDIEFA+K LE  EKI
121 YQVVRCFDDAEIIHVEGDVDPVRDLEIINQELRLKDIEFAQKALEGAEKI 170     S. cerevisiae
```

SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Proteine zur Modulation der Signaltransduktion

<130> M/42278/PCT

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 1410
<212> DNA
<213> Ashbya gossypii

<220>
<221> misc_feature
<223> Oligo 55

<400> 1
gatcacgaat actgggaaaa atactacact ttaggattat catccgagtc tagttatgat 60
acccgaaaga ataccgataa tgatacaaat cccattggca tgtctggtac ctgcccaagg 120
gaagcaaata ccgccccagt ttcaaagcaa gagaatgaaa taataaggat acctatatat 180
tggagaatca tacactgtca tccaatgatg agggggattg acctggatga attagaccgg 240
aaaatacgtc taaagagcaa ggaatataac tttgtgactc cgggtttaca tgcagcgctg 300
actggttcag cacgtcactg tttcgaccca actggagatt catatcatca gatcagtgac 360
ccgagtttcc ctcctaatta tagtattggt gacgggaata agggaacacc cgcgtcattt 420
gctgcaccta gtgattcagg agacttacca gtctctctta gggtcacagc acaggataga 480
gctggtgaca atgtggcatt ttctgacgag actaacgatg tacattttgc tcaaggcacc 540

aaaggcatag acggacagtc cgtagctgat tctggaagcc agatgattga tcttttaagc 600

tttttaaagg gacatgagga ccgcccatcc agagacacaa tcactcacca atgaaaagca 660

cttttcgttc cgcggccttt gccacaggta gcgattagat gttgcagtat aacttatcat 720

tactaatttg taattactta tttaatcagg ctcattgagt cgttatgcca accaatttca 780

tccgtttgaa tatgaggatg cgtcttagcc atcattgaat tttgcatggg atgtgctgta 840

caatctgtat ataaggtctg tatatggcca cattaaagcc cacccattga agctaccctt 900

caacccgacg aacccacagt gctcatgaag agattggagt gccactcgag cgaagccgac 960

tgctttcgca tttctttgac gacgtcgaac tgcgcgaagc aaatcccccc tggatctaat 1020

gactatcttc tccagcgggc gatatttgaa agactactca gtgccggagt ggactatgac 1080

ctctacgcca tcggatttca agaattgctc ccgatctggg atgcatcgtg cccgttgcag 1140

accaagtcgt gtttgcggcg tctggtgcct gttatccttc aacgcttgaa tagcggcgtt 1200

gaggatacgc ccgaagtgcc agtcgacaga aacgttcagc acaggcgaag cagattcgct 1260

cttggggtca ttggagctgc caagctattg gcgataccga gcagtctacc caaaatgcgt 1320

ggccctctag acaagttccg gttagctaca gattcgttgc gtgcaatgca ataggtgcag 1380

taggactaat gctttttgcc aaggaagatc 1410

<210> 2

<211> 82

<212> PRT

<213> Ashbya gossypii

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Oligo 55

<400> 2

Phe Arg Ile Ser Leu Thr Thr Ser Asn Cys Ala Lys Gln Ile Pro Leu
1 5 10 15

Gly Ser Asn Asp Tyr Leu Leu Gln Arg Ala Ile Phe Glu Arg Leu Leu
20 25 30

Ser Ala Gly Val Asp Tyr Asp Leu Tyr Ala Ile Gly Phe Gln Glu Leu
35 40 45

Leu Pro Ile Trp Asp Ala Ser Cys Pro Leu Gln Thr Lys Ser Cys Leu
50 55 60

Arg Arg Leu Val Pro Val Ile Leu Gln Arg Leu Asn Ser Gly Val Glu
65 70 75 80

Asp Thr

<210> 3

<211> 1565

<212> DNA

<213> Ashbya gossypii

<220>

<221> CDS

<222> (557)..(958)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<223> Oligo 55

<400> 3
ccctcctaat tatagtattg gtgacgggaa taagggaaca cccgcgtcat ttgctgcacc 60

tagtgattca ggagacttac cagtctctct tagggtcaca gcacaggata gagctggtga 120

caatgtggca ttttctgacg agactaacga tgtacatttt gctcaaggca ccaaaggcat 180

agacggacag tccgtagctg attctggaag ccagatgatt gatcttttaa gctttttaaa 240

gggacatgag gaccgcccat ccagagacac aatcactcac caatgaaaag cacttttcgt 300

tccgcggcct ttgccacagg tagcgattag atgttgcagt ataacttatc attactaatt 360

tgtaattact tatttaatca ggctcattga gtcgttatgc caaccaattt catccgtttg 420

aatatgagga tgcgtcttag ccatcattga attttgcatg ggatgtgctg tacaatctgt 480

atataaggtc tgtatatggc cacattaaag cccacccatt gaagctaccc ttcaacccga 540

cgaacccaca gtgctc atg aag aga ttg gag tgc cac tcg agc gaa gcc gac 592

Met Lys Arg Leu Glu Cys His Ser Ser Glu Ala Asp
1 5 10

tgc ttt cgc att tct ttg acg acg tcg aac tgc gcg aag caa atc ccc 640
Cys Phe Arg Ile Ser Leu Thr Thr Ser Asn Cys Ala Lys Gln Ile Pro
15 20 25

ctt gga tct aat gac tat ctt ctc cag cgg gcg ata ttt gaa aga cta 688
Leu Gly Ser Asn Asp Tyr Leu Leu Gln Arg Ala Ile Phe Glu Arg Leu
30 35 40

ctc agt gcc gga gtg gac tat gac ctc tac gcc atc gga ttt caa gaa 736
Leu Ser Ala Gly Val Asp Tyr Asp Leu Tyr Ala Ile Gly Phe Gln Glu
45 50 55 60

ttg ctc ccg atc tgg gat gca tcg tgc ccg ttg cag acc aag tcg tgt 784
Leu Leu Pro Ile Trp Asp Ala Ser Cys Pro Leu Gln Thr Lys Ser Cys
65 70 75

ttg cgg cgt ctg gtg cct gtt atc ctt caa cgc ttg aat agc ggc gtt 832
Leu Arg Arg Leu Val Pro Val Ile Leu Gln Arg Leu Asn Ser Gly Val
80 85 90

gag gat acg ccc gaa gtg cca gtc gac aga aac gtt cag cac agc gaa 880
Glu Asp Thr Pro Glu Val Pro Val Asp Arg Asn Val Gln His Ser Glu
95 100 105

gca gat tcg ctc ttg ggg tca ttg gag ctg cca agc tat tgg cga tac 928
Ala Asp Ser Leu Leu Gly Ser Leu Glu Leu Pro Ser Tyr Trp Arg Tyr
110 115 120

cga gca gtc tac cca aaa tgc gtg gcc ctc tagacaagtt ccggttagct 978
Arg Ala Val Tyr Pro Lys Cys Val Ala Leu
125 130

acagattcgt tgcgtgcaat gcaataggtg cagtaggact aatgcttttt gccaaggaag 1038

atctgggacc acgcggcagg gaatgtaatt gtgcgcgagg ctggcggcgt gcatactgac 1098

gcagtcttag gccagccact cgacttcggc gccggcagaa ctcttttaac taaaggcgtc 1158

atcgccagct gcggtccagc gtctgtccac gagcacgtgg tttcaatatc gtcagacgtg 1218

attaaaaacc gttgaattcc tcgagcaaaa accttagcga gttcgtattc cggaatattg 1278

tttgttgtat gcacttttta ggcaaatatt tccttgtagc taggggtggc tccggagaga 1338

tgccagcagc tctaaatacg ccatgttatg atactcagcg caggcgactt gtcgcaccgc 1398

cgaggtgtct cagtttctaa tagcttgttc cttccggatg cggtgagctt gcgaggcact 1458

atatgtgtcg tagatttaac ttgtctttta acgtgcgtac aacggacgac ggtatctgtg 1518

agtaagggta gtcttcttgc aagtcacctt gagtgtgtca gcccaac 1565

<210> 4

<211> 134

<212> PRT

<213> Ashbya gossypii

<220>

<221> misc_feature

<223> Oligo 55

<400> 4

Met Lys Arg Leu Glu Cys His Ser Ser Glu Ala Asp Cys Phe Arg Ile
1 5 10 15

Ser Leu Thr Thr Ser Asn Cys Ala Lys Gln Ile Pro Leu Gly Ser Asn
20 25 30

Asp Tyr Leu Leu Gln Arg Ala Ile Phe Glu Arg Leu Leu Ser Ala Gly
35 40 45

Val Asp Tyr Asp Leu Tyr Ala Ile Gly Phe Gln Glu Leu Leu Pro Ile
50 55 60

Trp Asp Ala Ser Cys Pro Leu Gln Thr Lys Ser Cys Leu Arg Arg Leu
65 70 75 80

Val Pro Val Ile Leu Gln Arg Leu Asn Ser Gly Val Glu Asp Thr Pro
85 90 95

Glu Val Pro Val Asp Arg Asn Val Gln His Ser Glu Ala Asp Ser Leu
100 105 110

Leu Gly Ser Leu Glu Leu Pro Ser Tyr Trp Arg Tyr Arg Ala Val Tyr
115 120 125

Pro Lys Cys Val Ala Leu
130

<210> 5

<211> 1217

<212> DNA

<213> Ashbya gossypii

<220>

<221> misc_feature

<223> Oligo 176

<400> 5
gatcttctcc acggcctcca ggtgcttctc cgcgaactca atgtccttca aacgcaattc 60

cgtgttaatg atgtccaggt ctctgaccgg gtcgacgtca ccctcaatgt ggatgatctc 120

ggcgtcgtcg aagcaacgca cgacctggta gatcgagtcc acagatctga tgtgcgataa 180

gaaggcattc cccagacctt cgcccttgct ggcacccttc gttagaccgg cgatgtcgta 240

cacagtcaag tgcgctggca ccttagaggc cggcttgtac acatcgcaca gggagtcgaa 300

gcgtggagat ggcacaatca cacgggcctc ctctgggtcg atggtagcaa acggatagtt 360

ggcagggtta cctagagggc atctggtaat cgcctggaag aacgtcgact taccgacgtt 420

agctagaccg acaatgcccg ctttaaggtt gttgccagga cggcccagca acaccttctt 480

ttcttcaact tgcttctttg gtggcatgga ggataattta tcagggtgcg tgtagtgttt 540

gaattgtgct cgactggcga attttcagca tttccgttaa tataatacct agaattagct 600

gatatagggc acttggtgct acgaaaaatt ttcagcaata tcgctgktga gctactcatt 660

tattacgtat aaccgggagt ggaagcgcgt tgctcacgcc tgcctccacg ctctcctcct 720

atttagagtg cttctgaagc agctgccgct actgcatact gggctggccc gctaacctgc 780

ttggaggtgt tcaakgggac tatatgacgt cacagaccgt gccgctgtgg ctgaaagcta 840

accttgcgtc caaaaaccac atcagagggg cggttagtgt agtggttatc attccaccct 900

tccaaggtgg agacacgggt tcgattctcg taccgctcag ttttttgttt gcaagaagaa 960

cctggcgaaa cgttactaaa ggtacgtacg gagtaggcaa tgttcgtcgt atttttaaac 1020

cagcatcatt taatacacaa tacacagagg cccatctgtg atacctgtag gaaggttgtg 1080

cttctaaggt taccacttac aacaccaacc cgttggcaag gtcaccgcaa agctccgcgc 1140

tgtcgctttt acactggacc ttcagggcga tacccttggt gctcttaatg agtcttamma 1200

rgrrggssrm sssrwyc 1217

<210> 6

<211> 169

<212> PRT

<213> Ashbya gossypii

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Oligo 176

<400> 6

Met Pro Pro Lys Lys Gln Val Glu Glu Lys Lys Val Leu Leu Gly Arg
1 5 10 15

Pro Gly Asn Asn Leu Lys Ala Gly Ile Val Gly Leu Ala Asn Val Gly
20 25 30

Lys Ser Thr Phe Phe Gln Ala Ile Thr Arg Cys Pro Leu Gly Asn Pro
35 40 45

Ala Asn Tyr Pro Phe Ala Thr Ile Asp Pro Glu Glu Ala Arg Val Ile
50 55 60

Val Pro Ser Pro Arg Phe Asp Ser Leu Cys Asp Val Tyr Lys Pro Ala
65 70 75 80

Ser Lys Val Pro Ala His Leu Thr Val Tyr Asp Ile Ala Gly Leu Thr
85 90 95

Lys Gly Ala Ser Lys Gly Glu Gly Leu Gly Asn Ala Phe Leu Ser His
100 105 110

Ile Arg Ser Val Asp Ser Ile Tyr Gln Val Val Arg Cys Phe Asp Asp
115 120 125

Ala Glu Ile Ile His Ile Glu Gly Asp Val Asp Pro Val Arg Asp Leu
130 135 140

Asp Ile Ile Asn Thr Glu Leu Arg Leu Lys Asp Ile Glu Phe Ala Glu
145 150 155 160

Lys His Leu Glu Ala Val Glu Lys Ile
165

<210> 7

<211> 3098

<212> DNA

<213> Ashbya gossypii

<220>

<221> CDS

<222> (1234)..(2412)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<223> Oligo 176

<400> 7

tcaacattac aaatacttta actgacgtgg ccttggacaa ggttactgtt atttgcacac 60

cagaagagga ttgctgaaat gacagagctt tgcgccatcc cattagacag attgttgccg 120

ggcgacaccg gttcctgctt catctcatac gagaaaccga cggcaactac ggtgggcttc 180

tttaacaacc tcaacttcac cactctggag cttgatcctg ctaccaatgc tccgttcgag 240

ggcgatgaag gcttccaaga tgagtacgag attgatgccc tatacctcca gccaggggac 300

tacatcaaat ccgtttttgt tggtgacttt gccgctacgt ttgaggagct accacacgag 360

gaggtggcag tttacaacct atcgcagtca ggcgcatccc tgcaggatat agtgaacaag 420

ctcgtattat cgaccaactg cttgccgctc gaaaactccc agtttgtgtc caccgaatca 480

aattccgcag ttgtcaagct tttcggaaag cacatcacta gcgaggatcg cgtcgccctc 540

cttgtaagac tcattaagag caccaagggt atcgccctga aggtccagtg taaaagcgac 600

agcgcggagc tttgcggtga ccttgccaac gggttggtgt tgtaagtggt aaccttagaa 660

gcacaacctt cctacaggta tcacgatggg cctctgtgta ttgtgtatta aatgatgctg 720

ttttaaaaat acgacgaaca ttgcctactc cgtacgtacc tttagtaacg tttcgccagg 780

ttcttcttgc aaacaaaaaa ctgagcggta cgagaatcga acccgtgtct ccaccttgga 840

agggtggaat gataaccact acactaaccg cccctctgat gtggtttttg gacgcaaggt 900

tagctttcag ccacagcggc acggtctgtg acgtcatata gtcccattga acacctccaa 960

gcaggttagc gggccagccc agtatgcagt agcggcagct gcttcagaag cactctaaat 1020

aggaggagag cgtggaggca ggcgtgagca acgcgcttcc actcccggtt atacgtaata 1080

aatgagtagc tcaacagcga tattgctgaa aatttttcgt agcaccaagt gccctatatc 1140

agctaattct aggtattata ttaacggaaa tgctgaaaat tcgccagtcg agcacaattc 1200

aaacactaca cgcaccctga taaattatcc tcc atg cca cca aag aag caa gtt 1254

```
                                        Met Pro Pro Lys Lys Gln Val
                                        1               5

gaa gaa aag aag gtg ttg ctg ggc cgt cct ggc aac aac ctt aaa gcg     1302
Glu Glu Lys Lys Val Leu Leu Gly Arg Pro Gly Asn Asn Leu Lys Ala
        10                  15                  20

ggc att gtc ggt cta gct aac gtc ggt aag tcg acg ttc ttc cag gcg     1350
Gly Ile Val Gly Leu Ala Asn Val Gly Lys Ser Thr Phe Phe Gln Ala
    25                  30                  35

att acc aga tgc cct cta ggt aac cct gcc aac tat ccg ttt gct acc     1398
Ile Thr Arg Cys Pro Leu Gly Asn Pro Ala Asn Tyr Pro Phe Ala Thr
40                  45                  50                  55

atc gac cca gag gag gcc cgt gtg att gtg cca tct cca cgc ttc gac     1446
Ile Asp Pro Glu Glu Ala Arg Val Ile Val Pro Ser Pro Arg Phe Asp
                60                  65                  70

tcc ctg tgc gat gtg tac aag ccg gcc tct aag gtg cca gcg cac ttg     1494
Ser Leu Cys Asp Val Tyr Lys Pro Ala Ser Lys Val Pro Ala His Leu
            75                  80                  85

act gtg tac gac atc gcc ggt cta acg aag ggt gcc agc aag ggc gaa     1542
Thr Val Tyr Asp Ile Ala Gly Leu Thr Lys Gly Ala Ser Lys Gly Glu
        90                  95                  100

ggt ctg ggg aat gcc ttc tta tcg cac atc aga tct gtg gac tcg atc     1590
Gly Leu Gly Asn Ala Phe Leu Ser His Ile Arg Ser Val Asp Ser Ile
    105                 110                 115

tac cag gtc gtg cgt tgc ttc gac gac gcc gag atc atc cac att gag     1638
Tyr Gln Val Val Arg Cys Phe Asp Asp Ala Glu Ile Ile His Ile Glu
120                 125                 130                 135

ggt gac gtc gac ccg gtc aga gac ctg gac atc att aac acg gaa ttg     1686
Gly Asp Val Asp Pro Val Arg Asp Leu Asp Ile Ile Asn Thr Glu Leu
                140                 145                 150

cgt ttg aag gac att gag ttc gcg gag aag cac ctg gag gcc gtg gag     1734
Arg Leu Lys Asp Ile Glu Phe Ala Glu Lys His Leu Glu Ala Val Glu
            155                 160                 165

aag atc acc aag aga ggc ggc cag tcc ctg gag gtg aaa cag aag aag     1782
Lys Ile Thr Lys Arg Gly Gly Gln Ser Leu Glu Val Lys Gln Lys Lys
        170                 175                 180

gag gag gcc gag ctg gtg aag cgc att atc gag ctt ttg aag tcg ggt     1830
Glu Glu Ala Glu Leu Val Lys Arg Ile Ile Glu Leu Leu Lys Ser Gly
    185                 190                 195

cag aga gtc gca aac cag tcc tgg agc acc aag gag gtg gag gtc atc     1878
Gln Arg Val Ala Asn Gln Ser Trp Ser Thr Lys Glu Val Glu Val Ile
200                 205                 210                 215

aac tcg atg ttc ctg cta acc gcc aag cca tcc atc tac ctg atc aac     1926
Asn Ser Met Phe Leu Leu Thr Ala Lys Pro Ser Ile Tyr Leu Ile Asn
                220                 225                 230

cta tcg gag cgg gac tac att aga aag aag aac aag cac ctc ttg aag     1974
Leu Ser Glu Arg Asp Tyr Ile Arg Lys Lys Asn Lys His Leu Leu Lys
            235                 240                 245
```

```
atc aag gag tgg atc gac aag tac tcc cct ggc gat cta att ata ccc     2022
Ile Lys Glu Trp Ile Asp Lys Tyr Ser Pro Gly Asp Leu Ile Ile Pro
        250                 255                 260

ttc tcg gtg tgc ctg gag gag aga ctg tcg cac atg agc gcc gag gag     2070
Phe Ser Val Cys Leu Glu Glu Arg Leu Ser His Met Ser Ala Glu Glu
    265                 270                 275

gct gtc gag gag tgc gag aag atc ggc gtc cag tcc gcc ttc cca aag     2118
Ala Val Glu Glu Cys Glu Lys Ile Gly Val Gln Ser Ala Phe Pro Lys
280                 285                 290                 295

atc atc acc acc atg aga cag aag ctg gat ctg atc tcg ttc ttc acc     2166
Ile Ile Thr Thr Met Arg Gln Lys Leu Asp Leu Ile Ser Phe Phe Thr
                300                 305                 310

tgc ggg ccc gac gaa gtc aga gaa tgg acc atc aga aat ggc act aag     2214
Cys Gly Pro Asp Glu Val Arg Glu Trp Thr Ile Arg Asn Gly Thr Lys
            315                 320                 325

gcg cca cag gct gcc ggc gtc att cac aat gac ttg atg aac acc ttt     2262
Ala Pro Gln Ala Ala Gly Val Ile His Asn Asp Leu Met Asn Thr Phe
        330                 335                 340

atc ctt gcg cag atc atg aaa tat gag gac gtc atg gag tac aag gac     2310
Ile Leu Ala Gln Ile Met Lys Tyr Glu Asp Val Met Glu Tyr Lys Asp
    345                 350                 355

gac aat gcc atc aag gcc gcc ggt aaa ctg ctg cag aag ggt aag gac     2358
Asp Asn Ala Ile Lys Ala Ala Gly Lys Leu Leu Gln Lys Gly Lys Asp
360                 365                 370                 375

tac gtt gtg gag gac ggt gac atc atc tac ttc aga gcg ggc gca ggc     2406
Tyr Val Val Glu Asp Gly Asp Ile Ile Tyr Phe Arg Ala Gly Ala Gly
                380                 385                 390

aaa aac taagctaagt atatgacggt aaaagcgcac agcttctcat tacgacatat      2462
Lys Asn
```

```
gtatctcata gctacgcaca gcccaaccta gatactatat acaggaggcg gaccggctgg   2522

gctcagaaca ggaaggaata ccacttttcc ttccgcttct cgcgctcagc cgcaggaacg   2582

tatgccttga cgtgctcctc gattttcgcc tggccagtct gctcgtcgta ctgccgtccc   2642

agcacgtcca cgaacgcgcc ctccgggtcc atcaggtaga agaagatccc tttagtgagg   2702

gttaattgcg gccgcgaatt cttgaagacg aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata   2762

ggttaatgtc atgataataa tggtttctta gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt   2822

gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta aatacattca aatatgtatc cgctcatgag   2882

acaataaccc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga gtattcaaca   2942

tttccgtgtc gcccttattc cctttttttgc ggcattttgc cttcctggtt ttgctcaccc   3002

agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag tggggttaca   3062

tcgaactgga tctcacagcg gtaagatcct tgagag                             3098
```

<210> 8

<211> 393

<212> PRT

<213> Ashbya gossypii

<220>

<221> misc_feature

<223> Oligo 176

<400> 8

Met Pro Pro Lys Lys Gln Val Glu Glu Lys Lys Val Leu Leu Gly Arg
1 5 10 15

Pro Gly Asn Asn Leu Lys Ala Gly Ile Val Gly Leu Ala Asn Val Gly
20 25 30

Lys Ser Thr Phe Phe Gln Ala Ile Thr Arg Cys Pro Leu Gly Asn Pro
35 40 45

Ala Asn Tyr Pro Phe Ala Thr Ile Asp Pro Glu Glu Ala Arg Val Ile
50 55 60

Val Pro Ser Pro Arg Phe Asp Ser Leu Cys Asp Val Tyr Lys Pro Ala
65 70 75 80

Ser Lys Val Pro Ala His Leu Thr Val Tyr Asp Ile Ala Gly Leu Thr
85 90 95

Lys Gly Ala Ser Lys Gly Glu Gly Leu Gly Asn Ala Phe Leu Ser His
100 105 110

Ile Arg Ser Val Asp Ser Ile Tyr Gln Val Val Arg Cys Phe Asp Asp
115 120 125

Ala Glu Ile Ile His Ile Glu Gly Asp Val Asp Pro Val Arg Asp Leu
130 135 140

Asp Ile Ile Asn Thr Glu Leu Arg Leu Lys Asp Ile Glu Phe Ala Glu
145 150 155 160

Lys His Leu Glu Ala Val Glu Lys Ile Thr Lys Arg Gly Gly Gln Ser

165 170 175

Leu Glu Val Lys Gln Lys Lys Glu Glu Ala Glu Leu Val Lys Arg Ile
180 185 190

Ile Glu Leu Leu Lys Ser Gly Gln Arg Val Ala Asn Gln Ser Trp Ser
195 200 205

Thr Lys Glu Val Glu Val Ile Asn Ser Met Phe Leu Leu Thr Ala Lys
210 215 220

Pro Ser Ile Tyr Leu Ile Asn Leu Ser Glu Arg Asp Tyr Ile Arg Lys
225 230 235 240

Lys Asn Lys His Leu Leu Lys Ile Lys Glu Trp Ile Asp Lys Tyr Ser
245 250 255

Pro Gly Asp Leu Ile Ile Pro Phe Ser Val Cys Leu Glu Glu Arg Leu
260 265 270

Ser His Met Ser Ala Glu Glu Ala Val Glu Glu Cys Glu Lys Ile Gly
275 280 285

Val Gln Ser Ala Phe Pro Lys Ile Ile Thr Thr Met Arg Gln Lys Leu
290 295 300

Asp Leu Ile Ser Phe Phe Thr Cys Gly Pro Asp Glu Val Arg Glu Trp
305 310 315 320

Thr Ile Arg Asn Gly Thr Lys Ala Pro Gln Ala Ala Gly Val Ile His
325 330 335

Asn Asp Leu Met Asn Thr Phe Ile Leu Ala Gln Ile Met Lys Tyr Glu
340 345 350

Asp Val Met Glu Tyr Lys Asp Asp Asn Ala Ile Lys Ala Ala Gly Lys
355 360 365

Leu Leu Gln Lys Gly Lys Asp Tyr Val Val Glu Asp Gly Asp Ile Ile
370 375 380

Tyr Phe Arg Ala Gly Ala Gly Lys Asn
385 390

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/08359

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/11 C12N15/55 C12N50/80 C12N9/16 C12N1/15
C07K14/37 C12P25/00

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

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, EMBL, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FELDMANN H ET AL: "COMPLETE DNA SEQUENCE OF YEAST CHROMOSOME II" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 13, no. 24, 15 December 1994 (1994-12-15), pages 5795-5809, XP000942152 ISSN: 0261-4189 page 5799 ---	1,2, 4-11,14, 17
X	DATABASE EMBL 'Online! 11 August 1997 (1997-08-11) Database accession no. Z74807 XP002218733 --- -/--	1,2, 4-11,14, 17

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

[X] 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
29 October 2002	13/11/2002

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	Barnas, C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/08359

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 61623 A (ALTHOEFER HENNING ;SEULBERGER HARALD (DE); BASF AG (DE); ZELDER OS) 2 December 1999 (1999-12-02) page 2, paragraph 2 page 3, line 45 page 11, line 36 page 17, paragraph 4 page 19, paragraphs 1,2 page 20, line 9-25 page 22, line 40	1-24

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internati[redacted] Application No
PCT/EP 02/08359

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9961623 A	02-12-1999	DE 19823834 A1	02-12-1999
		AU 4140999 A	13-12-1999
		CN 1303434 T	11-07-2001
		WO 9961623 A2	02-12-1999
		EP 1082438 A2	14-03-2001
		JP 2002516108 T	04-06-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/08359

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/11 C12N15/55 C12N50/80 C12N9/16 C12N1/15
C07K14/37 C12P25/00

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

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

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, EMBL, SEQUENCE SEARCH, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FELDMANN H ET AL: "COMPLETE DNA SEQUENCE OF YEAST CHROMOSOME II" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 13, Nr. 24, 15. Dezember 1994 (1994-12-15), Seiten 5795-5809, XP000942152 ISSN: 0261-4189 Seite 5799 ---	1,2, 4-11,14, 17
X	DATABASE EMBL 'Online! 11. August 1997 (1997-08-11) Database accession no. Z74807 XP002218733 ---	1,2, 4-11,14, 17

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] 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
29. Oktober 2002	13/11/2002

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	Barnas, C

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/08359

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 61623 A (ALTHOEFER HENNING ;SEULBERGER HARALD (DE); BASF AG (DE); ZELDER OS) 2. Dezember 1999 (1999-12-02) Seite 2, Absatz 2 Seite 3, Zeile 45 Seite 11, Zeile 36 Seite 17, Absatz 4 Seite 19, Absätze 1,2 Seite 20, Zeile 9-25 Seite 22, Zeile 40	1-24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/08359

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☒ Anspruche Nr. 15-17, 19 (teilw.)
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN **PCT/ISA/ 210**

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 15-17, 19 (teilw.)

Die geltenden Patentansprüche 15-17 und 19 beziehen sich auf ein Produkt jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich ein Effektor welcher mit einem Polypeptid nach Anspruch 7 oder einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz wechselwirkt.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Antikörper oder antigenbindenden Fragmente davon sowie Antisense-Nukleinsäuresequenzen, wie in Anspruch 17(a)(d) beschrieben.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/08359

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9961623 A	02-12-1999	DE	19823834 A1	02-12-1999
		AU	4140999 A	13-12-1999
		CN	1303434 T	11-07-2001
		WO	9961623 A2	02-12-1999
		EP	1082438 A2	14-03-2001
		JP	2002516108 T	04-06-2002