

(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
16. Dezember 2004 (16.12.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/108932 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/31**,
1/21, C07K 14/31, 14/32, C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/001107

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. Mai 2004 (28.05.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 25 026.3 2. Juni 2003 (02.06.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH**
[DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, 52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **KÖBERLING, Oliver**
[DE/DE]; Gladbacher Strasse 29, 40219 Düsseldorf (DE).
FREUDL, Roland [DE/DE]; Isolastrasse 1, 52353 Düren
(DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **FORSCHUNGSZENTRUM
JÜLICH GMBH**; Fachbereich Patente, 52425 Jülich
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

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

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

(54) **Title:** BACTERIA WITH INCREASED LEVELS OF PROTEIN SECRETION, NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR
A SECA PROTEIN WITH INCREASED LEVELS OF PROTEIN SECRETION, AND METHOD FOR PRODUCING PROTEINS

(54) **Bezeichnung:** BAKTERIEN MIT ERHÖHTER PROTEINSEKRETION, NUKLEOTIDSEQUENZEN CODIEREND FÜR
EIN SECA PROTEIN MIT ERHÖHTER PROTEINSEKRETION SOWIE VERFAHREN ZUR PRODUKTION VON PROTEINEN

(57) **Abstract:** The invention relates to bacteria that have increased levels of protein secretion due to genetic modification, to nu-
cleotide sequences and gene structures containing at least one gene coding for a SecA protein having increased levels of protein
secretion, to a SecA having increased levels of protein secretion, and to a method for producing desired proteins using the inventive
bacteria. The invention also relates to nucleic acids coding for a SecA protein having increased levels of protein secretion and con-
taining a gene sequence SecA<i> </i> or an allele, homologue or derivative of said nucleotide sequences or nucleotide sequences
hybridising therewith and comprising at least one mutation. Surprisingly, just one mutation in a nucleotide of a SecA gene leads to
increased levels of protein secretion or to protein secretion for the first time.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft Bakterien, die auf Grund genetischer Modifikation eine erhöhte Sekretion für Pro-
teine aufweisen, Nukleotidsequenzen sowie Genstrukturen, die mindestens ein Gen enthalten, welches für ein SecA Protein mit
erhöhter Sekretion für Proteine codiert, ein SecA mit erhöhter Proteinsekretion sowie ein Verfahren zur Produktion gewünschter
Proteine unter Verwendung der erfindungsgemässen Bakterien. Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuren codierend für ein
SecA Protein mit erhöhter Sekretion für Proteine, enthaltend eine Gensequenz SecA oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser
Nukleotidsequenzen oder mit diesen hybridisierende Nukleotidsequenzen, welche mindestens eine Mutation aufweisen. In über-
raschender Weise wurde festgestellt, dass bereits eine Mutation in einem Nukleotid des secA Gens zu einer erhöhten Sekretion für
Proteine bzw. zu einer erstmals möglichen Sekretion von Proteinen führt.

WO 2004/108932 A1

B e s c h r e i b u n g

Bakterien mit erhöhter Proteinsekretion,
Nukleotidsequenzen codierend für ein SecA Protein mit
erhöhter Proteinsekretion sowie Verfahren zur
Produktion von Proteinen

Die Erfindung betrifft Bakterien, die auf Grund genetischer Modifikation eine erhöhte Sekretion von Proteinen aufweisen, Nukleotidsequenzen sowie Plasmide, die mindestens ein Gen enthalten, welches für ein SecA Protein
5 mit erhöhter Sekretion für Proteine codiert, ein SecA mit erhöhter Proteinsekretion sowie ein Verfahren zur Produktion gewünschter Proteine unter Verwendung der erfindungsgemäßen Bakterien.

Gram-positive Bakterien (v.a. verschiedene *Bacillus*-
10 Arten) können Proteine in großen Mengen in das umgebende Kulturmedium ausscheiden. Diese Fähigkeit wird schon seit langem für die industrielle Gewinnung einer Vielzahl von sekretierten Enzymen (wie z. B. Amylasen, Proteasen, Lipasen) eingesetzt. Die von der Industrie für
15 diese Prozesse verwendeten Produktionsstämme werden durch wiederholte ungerichtete Mutagenese und anschließendes Screening auf eine gesteigerte Exoenzymproduktion hin optimiert, was zu Ausbeuten von mehreren Gramm Enzym pro Liter Kulturüberstand führen kann. Die Ursachen
20 für die erhöhten Produktivitäten dieser Stämme sind meist nicht bekannt. Verschiedene Versuche, Gram-positive Bakterien als Wirtsorganismen für die sekretorische Gewinnung von heterologen Proteinen einzusetzen, lieferten oft nur ein enttäuschendes Ergebnis. Die erhaltenen Ausbeuten waren in den allermeisten Fällen
25

deutlich geringer als die Mengen, die bei der Sekretion von homologen Exoproteinen erreicht werden können. Einer der Gründe hierfür ist der ineffiziente oder gar völlig ausbleibende Transport des heterologen Proteins
5 über die Cytoplasmamembran [1-4].

Der Transport von Proteinen über die bakterielle Plasmamembran wird durch die sogenannte Sec-Translokase (Fig.1) katalysiert. Diese besteht aus den membranintegralen Bestandteilen SecY, SecE, SecG, SecD, SecF und YajC sowie der zentralen Komponente SecA, die als sogenannte Translokations-ATPase die Energie der ATP-Bindung und -Hydrolyse an die Translokation der Polypeptidkette über die Membran koppelt [5,6].

Eine effiziente Initiation der Translokation eines sekretorischen Proteins über die bakterielle Cytoplasmamembran erfordert die Ausbildung eines funktionellen Komplexes aus mindestens dem SecA Protein, SecY und dem
10 Exportprotein an der Membran. In Folge dieser funktionellen Wechselwirkungen, sowie dem Austausch von ADP gegen ATP an der Nukleotidbindestelle 1 (NBS I) von SecA, führt eine Konformationsänderung zur Membraninsertion von SecA, sowie der Aktivierung der SecA ATPase
15 Aktivität und der Initiation der Translokation. Die ATP Hydrolyse an SecA wird durch einen zweifachen intramolekularen Mechanismus reguliert. Untersuchungen in *Escherichia coli* zeigten, dass im freien cytosolisch vorliegenden SecA die ATPase Aktivität durch Wechsel-
20 wirkungen der regulatorischen Elemente IRA-1 und IRA-2 (intramolekularer Regulator der ATP Hydrolyse) mit der NBS 1 herabreguliert wird. Es wird angenommen, dass die

auf Grund funktioneller Wechselwirkungen zwischen SecA, SecY und dem Exportprotein hervorgerufene Konformationsänderung von SecA zu einer räumlichen Entfernung vom IRA-1 und IRA-2 von der NBS 1 führt, wodurch die
5 SecA ATPase aktiviert wird [7,8].

Bei der sekretorischen Gewinnung von heterologen Proteinen mit gram-positiven Bakterien kann die Translokation einen limitierenden Schritt auf Grund der Qualitätskontrolle oder "Proofreading Aktivität" der Translokase darstellen. Dieser Kontrollmechanismus ist für die Zelle notwendig, um bezüglich der eigenen Proteine nur diejenigen in den Sekretionsweg einzuschleusen, die für den Export aus dem Cytosol bestimmt sind. Hinsichtlich
10 heterologer Proteine, die nicht optimal an den fremden Exportapparat angepasst sind, kann diese Qualitätskontrolle jedoch einen wesentlichen limitierenden Schritt darstellen. Sehr wahrscheinlich ist die Fähigkeit der heterologen Exportproteine zur Aktivierung der Translokations-ATPase-Aktivität des SecA Proteins entscheidend
15 dafür, ob und mit welcher Effizienz ein Membrantransport des heterologen Exportproteins stattfindet bzw. ob und in welchem Ausmaß eine Zurückweisung des heterologen Exportproteins durch die Qualitätskontrolle der
20 Sec-Translokase erfolgt.
25

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, Nukleotidsequenzen, Proteinsequenzen, Bakterien sowie ein Verfahren bereit zu stellen, mit denen eine gegenüber bisher bekannten mikrobiologischen Prozessen verbesserte sekretorische
30 Gewinnung von Proteinen möglich wird.

Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 1 wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 angegebenen Merkmalen. Weiterhin wird die Aufgabe ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 11 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 11 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird außerdem ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 21 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 21 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird ebenso ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 22 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 22 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird weiterhin ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 23 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 23 angegebenen Merkmalen. Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 30 wird die Aufgabe ebenfalls erfindungsgemäß gelöst, durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 30 angegebenen Merkmale. Weiterhin wird die Aufgabe ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 31 erfindungsgemäß gelöst, durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 31 angegebenen Merkmale.

Mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sowie Polypeptiden ist es nunmehr möglich, Proteine, die bisher nur in geringer Menge oder gar nicht von den Mikroorganismen exportiert wurden, sekretorisch mit Mikroorganismen zu gewinnen bzw. mit einer erhöhten Effizienz herzustellen. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren codieren gegenüber natürlich vorkommenden oder gentechnisch nicht veränderten Nukleinsäuren für ein Translokations-ATPase Protein, im folgenden mit SecA bezeichnet, wel-

ches eine erhöhte Sekretion für Proteine bewirkt bzw. aufweist. Unter der Bezeichnung „erhöhte Sekretion“ wird eine im Vergleich zu Wild Typ Organismen erhöhte oder auch zum ersten Mal mögliche Proteinsekretion ver-
5 standen. Weiterhin ist es möglich, Mikroorganismen und Verfahren bereitzustellen, mit denen eine Sekretion und Produktion von Proteinen mit gegenüber bisher bekannten mikrobiellen Verfahren höheren Ausbeuten bzw. zum ers-
ten Mal möglich ist.

10

Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Gegenstand der Erfindung ist ein *SecA* Protein (Translo-
15 kations-ATPase), mit einer Aminosäuresequenz, welches gegenüber der Wild Typ *SecA* Aminosäuresequenz mindestens eine Veränderung der Aminosäuresequenz aufweist oder eine modifizierte Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon, wodurch ein *SecA* mit erhöhter
20 Sekretion für Proteine ausgebildet wird.

In überraschender Weise wurde festgestellt, dass bereits eine Veränderung (= Austausch) einer Aminosäure der Aminosäuresequenz des *SecA* Proteins zu einer erhöhten Sekretion für Proteine bzw. zu einer erstmals mög-
25 lichen Sekretion von Proteinen führt. Mehrere ausgetauschte Aminosäuren, beispielsweise 2 bis 7, können jedoch ebenfalls die erhöhte Sekretion für Proteine bewirken.

Veränderungen im Bereich der Aminosäuresequenzen, die
30 für die Ausbildung der regulatorischen Elemente IRA-1/IRA-2 verantwortlich sind oder eine modifizierte Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon, erwie-

sen sich als vorteilhaft für das SecA mit erhöhter Sekretion für Proteine, wobei hier der Begriff „Bereich“ nicht nur Veränderungen umfassen soll, die genau in den Aminosäurepositionen liegen, die für die Ausbildung der IRA-1/IRA-2 verantwortlich sind, sondern auch Veränderungen, die beispielsweise 250 bis 300 Aminosäuren vor oder hinter den jeweiligen Aminosäurepositionen für IRA-1 bzw. IRA-2 liegen.

Die Positionen der erfindungsgemäßen Veränderungen in der Aminosäuresequenz des SecA können innerhalb unterschiedlicher Mikroorganismen verschoben sein. So sollen ausgehend von den Veränderungen in den Aminosäurepositionen des SecA von *Staphylococcus carnosus* auch die Veränderungen in der Aminosäuresequenz des SecA anderer Mikroorganismen umfasst sein, die diesen Positionen entsprechen.

Es konnte sowohl durch eine einzige Veränderung als auch durch mehrere Veränderungen im Bereich der Aminosäuresequenz, die für die Ausbildung von IRA-1 bzw. IRA-2 verantwortlich ist, sowie durch Kombinationen von Veränderungen in diesen Bereichen, ein SecA mit erhöhter Sekretion für Proteine erhalten werden.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus gram-positiven oder gram-negativen Bakterien, bevorzugt aus der Familie der Bacillaceae, Staphylococcaceae, Enterobacteriaceae oder Corynebacteriaceae, besonders bevorzugt der Gattung *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Escherichia* oder *Corynebacterium*, ganz besonders bevorzugt der Art *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Staphylococcus carnosus*, *Escherichia coli* oder *Corynebacterium*

glutamicum stammen. Beispiele für in Stammkulturen bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) erhältliche Bakterien sind z. B. *Bacillus subtilis* 168 bzw. *Staphylococcus*
5 *carneus* TM 300. Die vorliegende Erfindung wird durch die Angabe der zuvor genannten Bakterienstämme näher charakterisiert, die jedoch nicht limitierend wirkt.

Bei *Staphylococcus carneus* erstrecken sich die Aminosäuresequenzen, die das IRA-1 im SecA ausbilden auf Position 721 bis 772 und für IRA-2 auf Position 448 bis
10 567.

Bei *Bacillus subtilis* erstrecken sich die Aminosäuresequenzen, die das IRA-1 im SecA ausbilden auf die Position 716 bis 767 und für IRA-2 auf die Position 442 bis
15 561.

Bei dem aus *Staphylococcus carneus* isolierten SecA Protein erwies sich mindestens eine Veränderung im Bereich der Aminosäuren von Position 198 bis 772 oder eine modifizierte Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon, als vorteilhaft.
20

Bei dem aus *Bacillus subtilis* isolierten SecA Protein erwies sich mindestens eine Veränderung im Bereich der Aminosäuren von Position 442 bis 767 oder eine modifizierte Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon, als vorteilhaft.
25

30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein SecA mit erhöhter Sekretion für Proteine oder ein Teil davon

enthaltend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No 2, welche mindestens eine Veränderung aus der Gruppe der Aminosäuren in Position 198, 470, 474, 493, 537, 665 und/oder 734 aufweist oder eine modifizierte Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon.

Folgende Aminosäureaustausche im SecA von *Staphylococcus carnosus* erwiesen (s. Fig. 2) sich beispielsweise als erfolgreich:

- Position 198: Tyrosin zu Histidin
- 10 Position 470: Histidin zu Glutamin
- Position 474: Alanin zu Valin
- Position 493: Alanin zu Valin
- Position 537: Asparaginsäure zu Alanin
- Position 665: Valin zu Glutaminsäure
- 15 Position 734: Asparaginsäure zu Valin

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenso ein SecA mit erhöhter Sekretion für Proteine mit einer Aminosäuresequenz gemäß der SEQ ID No 4, welche mindestens eine Veränderung aus der Gruppe der Aminosäuren in Position 464, 468, 487, 531 und/oder 729 aufweist oder eine modifizierte Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon.

Folgende Aminosäureaustausche im SecA von *Bacillus subtilis* erwiesen (s. Fig. 2) sich beispielsweise als erfolgreich:

- Position 464: Histidin zu Glutamin
- Position 468: Alanin zu Valin
- Position 487: Alanin zu Valin
- Position 531: Asparaginsäure zu Alanin
- 30 Position 729: Asparaginsäure zu Valin

Unter Isoformen sind Proteine mit gleicher oder vergleichbarer Wirkungsspezifität zu verstehen, die jedoch eine unterschiedliche Primärstruktur aufweisen.

- 5 Unter modifizierten Formen sind erfindungsgemäß Proteine zu verstehen, bei denen Änderungen in der Sequenz, beispielsweise am C- oder N-Terminus des Polypeptids oder im Bereich konservierter Aminosäuren vorliegen, ohne jedoch die Funktion der erhöhten Proteinsekretion
10 zu beeinträchtigen. Diese Veränderungen können in Form von Aminosäureaustauschen nach an sich bekannten Methoden vorgenommen werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Polypeptide
15 mit der Funktion eines *SecA* mit erhöhter Sekretion für Proteine, die in ihrer Aminosäuresequenz derart verändert sind, dass sie homologe und/oder heterologe Proteine mit erhöhter Aktivität aus den Zellen exportieren können.

20

Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuren codierend für ein *SecA* mit erhöhter Sekretion für Proteine, enthaltend eine Gensequenz *secA*, welche im *secA* Gen mindestens eine Mutation aufweisen oder ein Allel, Homolog
25 oder Derivat dieser Nukleotidsequenzen oder mit diesen hybridisierende Nukleotidsequenzen.

In überraschender Weise wurde festgestellt, dass bereits eine Mutation in einem Nukleotid des *secA* Gens zu einer erhöhten Sekretion für Proteine bzw. zu einer
30 erstmals möglichen Sekretion von Proteinen führt. Mehrere Mutationen, beispielsweise 2 bis 7, können jedoch ebenfalls die erhöhte Sekretion der Proteine bewirken.

Mindestens eine Mutation in Nukleotidbereichen, die für die regulatorischen Elemente IRA-1 und/oder IRA-2 der SecA-Proteine codieren oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenzen oder mit diesen hybridisierende Nukleotidsequenzen, erwies sich als vorteilhaft für die Expression eines SecA mit erhöhter Sekretion für Proteine, wobei unter dem Begriff „Bereich“ nicht nur Mutationen umfasst sein sollen, die genau in den für die IRA-1/IRA-2 codierenden Bereichen liegen, sondern auch Mutationen umfasst sein sollen, die beispielsweise 750 bis 900 Nukleotide vor oder hinter den jeweils für IRA-1/IRA-2 codierenden Bereichen liegen.

Es konnte sowohl durch eine einzige Mutation als auch durch mehrere Mutationen im Bereich der für IRA-1 bzw. IRA-2 codierenden Nukleotidsequenzen sowie Kombination von Mutationen in diesen Bereichen, ein erhöhter Export von Proteinen bewirkt werden.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus gram-positiven oder gram-negativen Bakterien, wie z. B. aus der Familie der Bacillaceae, Staphylococcaceae, Enterobacteriaceae oder Corynebacteriaceae, bevorzugt der Gattung *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Escherichia* oder *Corynebacterium*, besonders bevorzugt aus *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* oder *Bacillus amyloliquefaciens*, *Staphylococcus carnosus*, *Escherichia coli* oder *Corynebacterium glutamicum* isoliert werden. Die vorliegende Erfindung wird durch die Angabe der zuvor genannten Bakterienstämme näher charakterisiert, die jedoch nicht limitierend wirkt.

Bei *Staphylococcus carnosus* erstreckt sich der Nukleotidbereich, der für IRA-1 codiert, auf die Nukleotide von Position 2161 bis 2316 und für IRA-2 von Position 1342 bis 1701 (s.a. SEQ ID No 1).

- 5 Bei *Bacillus subtilis* erstreckt sich der Nukleotidbereich, der für IRA-1 codiert, auf die Nukleotide von Position 2146 bis 2301 und für IRA-2 von Position 1324 bis 1683 (s.a. SEQ ID No 3).

Bei den aus *Staphylococcus carnosus* isolierten Nukleinsäuren erwies sich mindestens eine Mutation im Bereich der Nukleotide von Position 592 bis 2210 oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenzen oder mit diesen hybridisierende Nukleotidsequenzen, als vorteilhaft.

- 15 Bei den aus *Bacillus subtilis* isolierten Nukleinsäuren erwies sich mindestens eine Mutation im Bereich der Nukleotide von Position 1392 bis 2186 oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenzen oder mit diesen hybridisierende Nukleotidsequenzen, als vorteilhaft.

Besonders vorteilhaft erwies sich eine Nukleinsäure enthaltend ein Gen *secA* gemäß SEQ ID No 1, welche mindestens eine Mutation im Gen aus der Gruppe der Nukleotide in Position 592, 1410, 1421, 1478, 1610, 1994 und/oder 2210 aufweist oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenzen oder mit diesen hybridisierende Nukleotidsequenzen.

Folgende Mutationen erwiesen sich im *secA*-Gen von *Staphylococcus carnosus* als erfolgreich:

Position 592: T zu C

Position 1410: T zu A

Position 1421: C zu T

Position 1478: C zu T

5 Position 1610: A zu C

Position 1994: T zu A

Position 2210: A zu T

Weiterhin besonders vorteilhaft erwies sich eine Nukleinsäure, enthaltend ein *secA* Gen gemäß SEQ ID No 3, welche mindestens eine Mutation aus der Gruppe der Nukleotide in Position 1392, 1403, 1404, 1460, 1461, 1592 und/oder 2186 aufweist oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenzen oder mit diesen hybridisierende Nukleotidsequenzen.

15 Folgende Mutationen erwiesen sich im *secA*-Gen von *Bacillus subtilis* als erfolgreich:

Position 1392: T zu A

Position 1403: C zu T

Position 1404: G zu T

20 Position 1460: C zu T

Position 1461: G zu T

Position 1592: A zu C

Position 2186: A zu T

Im Gegensatz zu den Mutationen in Position 1392, 1592 und 2186 führen die beiden Mutationen der Nukleotide in Position 1403 und 1404 bzw. 1460 und 1461 auf Proteinebene jeweils zum Austausch nur einer Aminosäure.

Mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können Proteine, die in Gegenwart eines unveränderten SecA nur in geringem Maße bzw. gar nicht exportiert werden, effizient aus den Zellen exportiert werden. Die erfindungs-

gemäßen Nukleinsäuren, die für ein SecA mit erhöhter Sekretion für Proteine codieren, bewirken einen veränderten Kontrollmechanismus des SecA für die Proteine, die aus der Zelle ausgeschleust werden. Insbesondere
5 heterologe Proteine, die nicht optimal an den Exportapparat der Wirtszelle angepasst sind, können nunmehr mit Hilfe der erfindungsgemäßen *secA* Sequenz besonders erfolgreich exportiert werden. Aber auch der Export von homologen Proteinen kann mit Hilfe der veränderten *secA*
10 Sequenz in vorteilhafter Weise verbessert werden.

Unter einer Nukleinsäure oder einem Nukleinsäurefragment ist erfindungsgemäß ein Polymer aus RNA oder DNA zu verstehen, das einzel- oder doppelsträngig sein kann
15 und optional natürliche, chemisch synthetisierte, modifizierte oder artifizielle Nukleotide enthalten kann. Der Begriff DNA-Polymer schließt hierbei auch genomische DNA, cDNA oder Mischungen davon ein.

20 Unter Allelen sind erfindungsgemäß äquivalente Nukleotidsequenzen zu verstehen, die für SecA Proteine mit erhöhter Sekretion für Proteine codieren. Äquivalente Sequenzen sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz, beispielsweise durch die Degenerierung des genetischen Codes bedingt, noch für das
25 SecA Protein mit der gewünschten erhöhten Sekretion für Proteine codieren. Äquivalente Nukleotidsequenzen umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z. B. durch
30 chemische Synthese erhaltene und gegebenenfalls an den Kodon-Gebrauch des Wirtsorganismus angepasste, Nukleotidsequenzen.

Unter äquivalenten Nukleotidsequenzen sollen auch Sequenzen mit Mutationen verstanden werden, insbesondere natürliche oder künstliche einer ursprünglich isolierten Sequenz, welche weiterhin für ein SecA Protein mit erhöhter Sekretion für Proteine codieren.

Mutationen der Äquivalente umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Inbegriffen sind hier auch sogenannte Sinnmutationen, die auf Proteinebene beispielsweise zum Austausch konservierter Aminosäuren führen können, welche aber zu keiner grundsätzlichen Veränderung der erhöhten Sekretion für Proteine des erfindungsgemäßen SecA Proteins führen und somit funktionsneutral sind. Dies beinhaltet auch Veränderungen der Nukleotidsequenz, die auf Proteinebene den C-Terminus oder N-Terminus eines Proteins betreffen, ohne jedoch die Funktion des Proteins wesentlich zu beeinträchtigen.

Durch die vorliegende Erfindung werden auch solche Nukleotidsequenzen umfasst, welche man durch Modifikation der Nukleotidsequenz, resultierend in entsprechenden Derivaten, erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z. B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen codierenden Sequenz oder z. B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen Gegenstand der vorliegenden Erfindung, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschten Eigenschaften vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch

Rückübersetzung von Aminosäuresequenzen mittels computergestützten Programmen ermittelt werden. Besonders geeignet sind codierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für den Wirtsorganismus spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit molekulargenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertung anderer, bereits bekannter Gene des zu transformierenden Organismus leicht ermitteln.

10

Unter homologen Sequenzen sind erfindungsgemäß solche zu verstehen, die zu den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen komplementär sind und/oder mit diesen hybridisieren. Der Begriff hybridisierende Sequenzen schließt erfindungsgemäß substanziell ähnliche Nukleotidsequenzen aus der Gruppe von DNA oder RNA ein, die unter an sich bekannten stringenten Bedingungen eine spezifische Wechselwirkung (Bindung) mit den zuvor genannten Nukleotidsequenzen eingehen. Hierzu zählen auch kurze Nukleotidsequenzen mit einer Länge von beispielsweise 10 bis 30, bevorzugt 12 bis 15 Nukleotiden. Dies umfasst erfindungsgemäß u.a. auch sogenannte Primer oder Sonden.

Erfindungsgemäß sind auch die den codierenden Bereichen (Strukturgenen) vorausgehenden (5'-oder upstream) und/oder nachfolgenden (3'-oder downstream) Sequenzbereiche eingeschlossen. Insbesondere sind hierin Sequenzbereiche mit regulatorischer Funktion inbegriffen. Sie können die Transkription, die RNA-Stabilität oder die RNA Prozessierung sowie die Translation beeinflussen. Beispiele für regulatorische Sequenzen sind u.a.

30

Promotoren, Enhancer, Operatoren, Terminatoren, Translationsverstärker oder Ribosomen-Bindestellen.

Prinzipiell können Gene durch an sich bekannte Methoden, wie beispielsweise die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit Hilfe von kurzen, synthetischen Nukleotidsequenzen (Primern) amplifiziert und anschließend isoliert werden. Die Herstellung der verwendeten Primer erfolgt im Allgemeinen anhand bekannter Gensequenzen aufgrund bestehender Homologien in konservierten Bereichen der Gene und/oder unter Berücksichtigung des GC-Gehalts der DNA des zu untersuchenden Mikroorganismus.

Eine weitere Vorgehensweise zur Isolierung von codierenden Nukleotidsequenzen ist die Komplementation von sogenannten Defekt-Mutanten, die zumindest phänotypisch einen Funktionsverlust in der Aktivität des zu untersuchenden Gens oder entsprechenden Proteins aufweisen.

Unter einer Komplementation ist die Aufhebung des Gendefektes der Mutante und weitgehende Wiederherstellung des ursprünglichen Erscheinungsbildes vor der Mutagenese zu verstehen, die durch die Einbringung funktioneller Gene oder Genfragmente erreicht wird.

25

Ein klassisches Mutagenese-Verfahren zur Herstellung von Defektmutanten ist beispielsweise die Behandlung der Bakterienzellen mit Chemikalien wie z. B.

N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin oder UV-Be-

strahlung. Derartige Verfahren zur Mutationsauslösung sind allgemein bekannt und können unter anderem bei Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Labora-

tory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology
5 (Washington D.C., USA, 1981) nachgelesen werden.

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Genstruktur enthaltend wenigstens eine der zuvor beschriebenen Nukleotidsequenzen codierend für ein SecA mit erhöhter
10 Sekretion für Proteine sowie mit diesen operativ verknüpfte regulatorische Sequenzen, welche die Expression der codierenden Sequenzen in der Wirtszelle steuern. Entsprechende Genstrukturen können beispielsweise Chromosomen, Plasmide, Vektoren, Phagen oder andere, nicht
15 zirkulär geschlossene, Nukleotidsequenzen sein.

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Vektor enthaltend eine Nukleotidsequenz der zuvor beschriebenen Art codierend für ein SecA mit erhöhter Sekretion für Proteine, mit dieser operativ verknüpfte regulative Nukleotidsequenzen sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur
20 Selektion transformierter Wirtszellen, für die Replikation innerhalb der Wirtszelle oder zur Integration in das entsprechende Wirtszell-Genom.

Als Vektoren eignen sich solche, die in Bakterien repliziert werden wie z. B. pWH1520 [17] pCU3 oder pXR100 (s. a. Figur 5, 6 bzw. 7). Andere Plasmidvektoren können in gleicher Weise verwendet werden. Diese Aufzählung ist für die vorliegende Erfindung jedoch nicht li-
30 mitierend.

Unter Ausnutzung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können entsprechende Sonden oder auch Primer synthetisiert und dazu verwendet werden, beispielsweise mit Hilfe der PCR-Technik analoge Gene aus anderen Mikroorganismen, bevorzugt gram-positiven Bakterien zu amplifizieren und isolieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch eine Sonde zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, codierend für am Export von Proteinen beteiligte Proteine, wobei diese Sonde ausgehend von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen der zuvor beschriebenen Art hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete Markierung enthält. Bei der Sonde kann es sich um einen Teilausschnitt der erfindungsgemäßen Sequenz, beispielsweise aus einem konservierten Bereich handeln, der z. B. eine Länge von 10 bis 30 oder bevorzugt 12 bis 15 Nukleotiden aufweist und unter stringenten Bedingungen spezifisch mit homologen Nukleotidsequenzen hybridisieren kann. Geeignete Markierungen sind aus der Literatur zahlreich bekannt. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994) oder beispielsweise im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Übertragung wenigstens einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder eines Teils davon, codierend für ein *SecA* mit erhöhter Sekretion für Proteine, ein
5 Allel, Homolog oder Derivat davon in ein Wirtssystem. Dies schließt auch die Übertragung einer erfindungsgemäßen Genstruktur in ein Wirtssystem ein. Diese Übertragung von DNA in eine Wirtszelle erfolgt nach gentechnischen Methoden. Als bevorzugtes Verfahren sei
10 hier die Transformation und besonders bevorzugt die Übertragung von DNA durch Elektroporation genannt. Als besonders geeignet haben sich gram-positive Wirtsorganismen erwiesen. Ein aus einer erfolgreich durchgeführten Nukleinsäureübertragung resultierender trans-
15 formierter Mikroorganismus unterscheidet sich von dementsprechend nicht transformierten Mikroorganismus dadurch, dass er Nukleinsäuren der erfindungsgemäßen Art enthält und entsprechend zur Ausprägung bringen kann. Stellvertretend für ein geeignetes Wirtssystem seien
20 Organismen der Gattung *Bacillus* oder *Staphylococcus* und bevorzugt der Art *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* bzw. *Staphylococcus carnosus* genannt. Als Kulturmedium ist je nach Anforderungen ein Komplexmedium wie z. B. LB Medium (T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A
25 Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1989)) oder auch ein Mineralsalzmedium, wie z. B. CGXII-Medium (Keilhauer, C. et al 1993, J. Bacteriol., 175:5593-5603) geeignet. Nach entsprechender Kultivierung kann die Bakteriensuspension ge-
30 erntet und zur weiteren Untersuchung, beispielsweise zur Transformation oder zur Isolierung von Nukleinsäu-

ren nach gängigen Methoden eingesetzt werden. Diese Vorgehensweise kann analog auch auf andere gram-positive oder gram-negative Bakterienstämme angewendet werden. Dabei werden als Wirtssysteme Bakterien der Gattung *Bacillus* oder *Staphylococcus* bevorzugt. Besonders bevorzugt kann hier die Art *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* oder *Staphylococcus carnosus* genannt werden.

Darüber hinaus schließt die vorliegende Erfindung auch Bakterienstämme als Wirtssystem ein, die sich als für die Proteinproduktion geeignete mutierte oder Wild-Typ Stämme auszeichnen, da ihr Stoffwechselfluss verstärkt in Richtung der Biosynthese von Proteinen verläuft. Ferner sind erfindungsgemäß auch diejenigen Mikroorganismen geeignet, die dem Fachmann aus mikrobiellen Herstellungsverfahren bekannt sind, wie z. B. *Enterobacteriaceae* oder *Corynebacteriaceae*.

Als Wirtsorganismen können auch Mikroorganismen eingesetzt werden, bei denen ein oder mehrere Gen(e) codierend für Proteine, Komponenten oder Faktoren, die für den Transport von Proteinen durch die bakterielle Plasmamembran verantwortlich sind, derart verändert sind, dass sie zusätzlich zu dem erfindungsgemäßen *SecA* Protein zu einem erhöhten Transport von Proteinen durch die Plasmamembran beitragen. Dies können beispielsweise die weiteren bekannten Bestandteile (*secY*, *secE*, *secG*, *secD*, *secF* und *yajC*) der *Sec*-Translokase sein. Beispielsweise seien hier Wirtsorganismen der Gattung *Bacillus* oder *Staphylococcus* genannt.

Die vorliegende Erfindung wird durch die ausgewählten Beispiele an Mikroorganismen näher charakterisiert, jedoch nicht limitiert.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus enthaltend in replizierbarer Form eine erfindungsgemäße Nukleinsäure der zuvor beschriebenen Art.

5

Ebenso umfasst die vorliegende Erfindung einen genetisch veränderten Mikroorganismus enthaltend in replizierbarer Form eine Genstruktur oder einen Vektor der zuvor beschriebenen Art.

- 10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist darüber hinaus auch ein genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit der Funktion einer im Vergleich zu dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus erhöhten Sekretion für Proteine. Ein erfindungsgemäß genetisch veränderter Mikroorganismus zeichnet sich ferner dadurch aus, dass er ein gram-positives oder gram-negatives Bakterium, wie beispielsweise ein Organismus aus der Familie der Bacillaceae, Staphylococcaceae, Enterobacteriaceae oder Corynebacteriaceae, besonders bevorzugt der Gattung Bacillus oder Staphylococcus ist. Besonders bevorzugt ist beispielsweise Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens oder Staphylococcus carnosus.

25

- Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Proteinen, wobei wenigstens eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, isoliert aus einem gram-positiven oder gram-negativen Bakterium, in einen Wirtsorganismus übertragen oder dort mit den dem Fachmann bekannten Mitteln erzeugt wird und dort exprimiert wird, dieser genetisch
- 30

veränderte Mikroorganismus zur mikrobiellen Herstellung von Proteinen eingesetzt wird und das entsprechend gebildete Protein aus dem Kulturmedium isoliert wird.

- 5 Die erfindungsgemäß hergestellten genetisch veränderten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der
- 10 Produktion von Proteinen kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren
- 15 und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

- Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlenhydrate wie z. B.
- 20 Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische
- 25 Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische stickstoff-
- 30

haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden natriumhaltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzu gegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 30°C bis 38°C und vorzugsweise bei

37°C. Die Kultur wird so lange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Proteins gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 8 bis 72 Stunden erreicht.

- 5 Die Analyse der Proteine kann durch Aktivitätsbestimmung, Sequenzierung oder Elektrophorese erfolgen.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Proteine beispielsweise aus Glucose, Saccharose, Lactose, Mannose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um die zuvor bereits näher beschriebenen Vertreter der gram-positiven oder gram-negativen Bakterien handeln. Hierbei zeichnen sich die

10 erfindungsgemäß genetisch veränderten Mikroorganismen durch eine erhöhte Protein-Sekretion gegenüber den entsprechend nicht veränderten Mikroorganismen (Wild Typen) oder den Mikroorganismen aus, die lediglich den Vektor ohne Gen-Insert enthalten. In einer besonderen

15 Ausführungsvariante der vorliegenden Erfindung ist gezeigt, dass die Expression des erfindungsgemäßen *secA* Gens im homologen *Bacillus subtilis* System (d.h. alle Komponenten des Sec-Transportapparats stammen aus *Bacillus subtilis*) zu einer wenigstens 3-fachen Steigerung der Protein-Akkumulation im Medium im Vergleich zu

20 den Kontrollstämmen führt. Durch Überexpression weiterer Gene, die positiv auf den allgemeinen Stoffwechsel der Protein-Biosynthese wirken, ist eine weitere Steigerung der Protein-Produktion zu erwarten.

30

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Pharmaproteine, Hormone, Enzyme, Wachstumsfaktoren oder beispielsweise

weise Cytokine hergestellt werden. So können beispielsweise Proteasen, Amylasen, Carbohydrasen, Lipasen, Epimerasen, Tautomerasen, Mutasen, Transferasen, Kinasen oder Phosphatasen mikrobiell hergestellt werden.

5

Die Figuren zeigen beispielhaft verwendete Plasmide, eine schematische Übersicht über den Sec-Proteinsekretionsapparat, eine Darstellung der SecA Proteine mit den erfindungsgemäßen Mutationen sowie einen experimen-
10 tellen Nachweis der erhöhten Proteinsekretion unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

Es zeigt:

15 Fig. 1:

Sec-Proteinsekretionsapparat gram-positiver Bakterien

Fig. 2:

Schematische Darstellung der SecA Proteine von *S. car-*
20 *nosus* und *B. subtilis*. Eingezeichnet sind die durch Selektion erhaltenen supprimierenden Mutationen des *S. carnosus* SecA. Die durch Pfeile markierten Mutationen wurden durch ortsgerichtete Mutagenese einzeln auf die korrespondierenden Aminosäurepositionen vom plasmid-
25 kodierten *B. subtilis* SecA übertragen.

Fig. 3:

Nachweis von PhoB bzw. PhoB L15Q mittels Western Blot in Zellextrakten und Kulturüberständen von *Bacillus*
30 *subtilis* DB 104 Stammes bei Co-Expression von plasmidkodiertem PhoB bzw. PhoB L15Q und mutierten SecA Proteinen. Die Induktion der PhoB Expression erfolgte mit

0,5 mM IPTG, die SecA Expression wurde mit 0,2 % Xylose induziert. **p**: PhoB L15Q Vorläufer; **m**: reifes PhoB (signifikant erhöhte Mengen sind mit Pfeil gekennzeichnet); **L15Q**: Variante der alkalischen Phosphatase PhoB, die

5 aufgrund eines Aminosäureaustausches von Leucin zu Glutamin an Position 15 in der Signalsequenz nur sehr ineffizient im unveränderten *Bacillus subtilis* exportiert wird; **pWA - secA**: Leervektor; **pWA + secA**: Vektor mit Wild Typ SecA; **pWAX**: Plasmid mit erfindungsgemäßer

10 Mutation des *secA* von *Bacillus subtilis*, X steht für eine der Mutationen in Position 464, 468, 487, 531 bzw. 729

Spur	Versuchsansatz
1	Zellextrakt; Plasmid pWA - secA, PhoB unverändert
2	Überstand; Plasmid pWA - secA, PhoB unverändert
3	Zellextrakt; Plasmid pWA - secA, L15Q
4	Überstand; Plasmid pWA - secA; L15Q
5	Zellextrakt; Plasmid pWA + secA; PhoB unverändert
6	Überstand; Plasmid pWA + secA; PhoB unverändert
7	Zellextrakt; Plasmid pWA + secA; L15Q
8	Überstand; Plasmid pWA + secA; L15Q
9	Zellextrakt; Plasmid pWA464; L15Q
10	Überstand; Plasmid pWA464; L15Q
11	Zellextrakt; Plasmid pWA468; L15Q
12	Überstand; Plasmid pWA468; L15Q
13	Zellextrakt; Plasmid pWA487; L15Q
14	Überstand; Plasmid pWA487; L15Q
15	Zellextrakt; Plasmid pWA531; L15Q
16	Überstand; Plasmid pWA531; L15Q
17	Zellextrakt; Plasmid pWA729; L15Q
18	Überstand; Plasmid pWA729; L15Q

Fig. 4:

Plasmidvektor pDEL6;

secAS.c.: secA-Gen von *Staphylococcus carnosus*;

cat: Chloramphenicol-Resistenzgen;

5 orf1 und orf3: Bereiche, die im Chromosom von *Bacillus subtilis* vor (orf1) bzw. hinter (orf3) dem secA Gen liegen. Diese Bereiche dienen dazu, das secA Gen im Chromosom von *Bacillus subtilis* gegen das secA Gen von *Staphylococcus carnosus* auszutauschen.

10 bla: Gensequenz codierend für β -Lactamase

Fig. 5:

Plasmidvektor pCU3seq; (entspricht dem pEF1 Plasmid aus
15 der Veröffentlichung [19])

cat: Chloramphenicol-Resistenzgen

P25/O: Bakteriophagen T5 Promotor PN₂₅/lac Operator

lacI: Gen kodierend für lac-Repressor

Pv: *B. subtilis* vegII Promotor

20 bla: β -Lactamase

Fig. 6:

Plasmidvektor pWH1520

bla: β -Lactamase

25 tet: Tetracyclin Resistenzgen

xylR: Repressorgen des Xylose Operons aus *Bacillus megaterium*

xylA⁺: N-terminales Fragment der Xylose Isomerase unter Kontrolle eines Xylose induzierbaren Promotors
30

Fig. 7:

Plasmidvektor pXR100;

bla: β -Lactamase

5 xylR : Repressorgen des Xylose Operons aus *Bacillus megaterium*

PxylA: Xylose induzierbarer Promotor der Xylose Iso-
merase

cat: Chloramphenicol- Resistenzgen

10 **Ausführungsbeispiele:**

Allgemeine Beschreibung:

Zunächst wurde ein *Bacillus subtilis* Stamm mit einer künstlich erhöhten Qualitätskontrolle des SecA Prote-
15 ins, (im folgenden RMA = replacement mutant SecA ge-
nannt), konstruiert.

Dieser Stamm wurde erzeugt, indem das auf dem Chromosom liegende *Bacillus subtilis* *secA*-Gen gegen das *secA*-Gen von *Staphylococcus carnosus* ausgetauscht wurde. Dieser
20 Austausch resultiert in einer künstlich erhöhten Quali-
tätskontrolle der Sec-Translokase. Als Modellprotein wurde das heterologe Protein OmpA aus *E. coli* einge-
setzt. Die künstlich erhöhte Qualitätskontrolle des SecA Proteins führte dazu, dass spezifisch das hetero-
25 loge Protein OmpA von *E. coli* vom Export ausgeschlossen wird. Daneben zeigt die RMA ein kältesensitives Wachs-
tum (d.h. kein Wachstum bei 25°C) sowie Defekte in der Sporenbildung und der Ausbildung von natürlicher Kompe-
tenz.

30 Im Folgenden wurden Suppressormutanten der RMA selekti-
oniert, die wieder bei 25°C wachsen können und/oder die wieder die Fähigkeit zur Sporenbildung besitzen. Die

Charakterisierung dieser Suppressormutanten ergab, dass in diesen Mutanten Veränderungen in dem fremden *secA* Gen aufgetreten waren. Die entsprechenden Aminosäureveränderungen betrafen vor allem die beiden Bereiche
5 IRA-1 und IRA-2, die an der Regulation der ATP-Hydrolyse an der NBS-1 von SecA beteiligt sind. Die weitere Charakterisierung der Suppressormutanten zeigte darüber hinaus, dass das in der RMA vom Export fast vollständig ausgeschlossene heterologe OmpA Protein in den Suppressormutanten deutlich besser exportiert werden kann.
10

Aufgrund des Vergleichs mit *Escherichia coli* SecA Mutanten aus Literaturdaten [10], die zum Teil mit den erfindungsgemäßen Mutationen im *secA* Gen bzw. den erfindungsgemäßen Veränderungen in der Aminosäuresequenz des
15 SecA Proteins an den entsprechenden Positionen identisch waren, kann angenommen werden, dass die in den IRA Elementen vom *Staphylococcus carnosus* SecA identifizierten Mutationen die Repression der ATP Hydrolyse an der NBS-1 in SecA abschwächen, wodurch die basale
20 ATPase Aktivität erhöht wird [9, 10]. Die veränderten *Staphylococcus carnosus* SecA Varianten stellen somit SecA Proteine dar, die einen besseren Export von normalerweise ineffizient oder gar nicht exportierten heterologen Proteinen erlauben.

25 Da die RMA und die isolierten Suppressormutanten alle noch das fremde *secA*-Gen von *Staphylococcus carnosus* besitzen und somit nach wie vor eine künstliche Situation mit einer gemischten Sec-Translokase darstellen,
30 wurden im Folgenden die gefundenen Veränderungen (einzeln und auch in Kombination) auf das homologe *Bacillus subtilis* SecA übertragen. Die Coexpression der mutier-

ten *Bacillus subtilis* SecA-Proteine mit verschiedenen ineffizient transportierten Exportproteinen in *Bacillus subtilis* zeigte, dass auch im nun homologen System (d.h. alle Komponenten des Sec-Transportapparats stammen aus *B. subtilis*) ein verbesserter Export der untersuchten Proteine zu beobachten war (gezeigt in Fig.3 am Beispiel einer ineffizient exportierten Variante der alkalischen Phosphatase PhoB von *B. subtilis*).

10 **1. Konstruktion der *Bacillus subtilis* SecA-Austauschmutante (RMA)**

Das pDEL6 Plasmid, welches zur Konstruktion der RMA verwendet wurde, wurde wie folgt konstruiert:

15 Ein pOrf3 Plasmid wurde durch Ligation eines 0,5 kb Asp718/Pst1 Fragmentes vom Plasmid pMKL4 [11] in das Plasmid pGEM3Z (Promega) erhalten. Ein 2,4 kb NsiI/Pst1 Fragment vom Plasmid pBO1 [12] wurde in das pOrf3 Plasmid ligiert, welches mit Pst1 verdaut wurde. Das *secA*

20 Gen des daraus resultierenden Plasmids pDEL1 wurde durch Verdau mit SpeI und SalI gegen ein 1,4 kb EcoRI/SalI Fragment vom pDG268 Plasmid [13], welches das Gen für die Chloramphenicol Acetyltransferase (*cat*) trägt, ausgetauscht, woraus das Plasmid pDEL3 resultierte. Anschließend wurden verschiedene *secA* Gene in

25 das mit SalI und PstI verdaute Plasmid pDEL3 ligiert. Das pDEL5 Plasmid trägt das *B. subtilis secA* Gen, welches durch SalI/PstI Verdau vom pMKL4 Plasmid [11] als 2,6 kb Fragment erhalten wurde. Das pDEL6 Plasmid trägt

30 das *S. carnosus secA* Gen, welches durch SacI/PstI Verdau vom pMA12 Plasmid [14] als 2,6 kb Fragment erhalten wurde. Das pDEL6 Plasmid, welches zur Konstruktion der

RMA eingesetzt wurde, enthält damit Bereiche aus fünf verschiedenen Plasmiden:

- *secA*-Gen aus dem Plasmid pMA12
- Chloramphenicol-Resistenzgen (*cat*) aus dem Plasmid
5 pDG268
- *orf1* aus Plasmid pBO4
- *orf3* aus Plasmid pMKL4
- Restlicher Bereich (*lacZ* und *bla*) aus Plasmid pGEM3Z

Die *Bacillus subtilis* *SecA*-Austauschmutante (RMA) wurde
10 erhalten, indem der Wildtypstamm *B. subtilis* DB104
(*his*, *nprR2*, *nprE18*, Δ *aprA3*) [15] mit dem linearisier-
ten Plasmid pDEL6 transformiert wurde und Klone selek-
tioniert wurden, die in Gegenwart von 10 μ g/ml Chlo-
ramphenicol wachsen konnten. Der *secA* Genaustausch wur-
15 de durch Southern-Blot Analysen verifiziert, wobei das
B. subtilis bzw. das *S. carnosus secA* Gen als Sonde
verwendet wurde.

2. Isolierung von Suppressormutanten der *B. subtilis*

20 RMA

Die *B. subtilis* RMA wurde als Parentalstamm verwendet,
um Suppressormutanten zu isolieren, die wieder bei 25
°C wachsen können, bzw. besser sporulieren können als
25 die RMA.

Zur Isolierung von kälteresistenten Suppressormutanten
der RMA wurde Luria-Bertani (LB) Medium nach Zugabe von
10 μ g/ml Chloramphenicol mit 10^6 Zellen der RMA beimpft
und 48 Stunden bei 25 °C inkubiert. Es wurden zwischen
30 100 und 1000 Zellen auf LB-Agarplatten ausplattiert und
weitere 24 Stunden bei 25 °C inkubiert. Alternativ wur-
den 10^6 Zellen aus einer Kultur der RMA, die über Nacht

bei 37 °C inkubiert wurde, direkt auf LB-Agarplatten
ausplattiert und 24 Stunden bei 25 °C inkubiert. Die
Stabilität der Mutation der so erhaltenen Suppressormu-
tanten wurde überprüft, indem die Mutanten nach Über-
5 impfen und Inkubation bei 37 °C auch nach erneutem
Überimpfen und Inkubation bei 25 °C weiterhin Wachstum
zeigten.

Zur Isolierung von Suppressormutanten, die wieder bes-
ser sporulieren können als die RMA, wurde 5 ml Sporula-
10 tionsmedium [16] 1:100 mit einer gewaschenen Übernacht-
kultur der RMA beimpft und mindestens 24 Stunden bei 37
°C inkubiert. 100 µl des Ansatzes wurden nach Zugabe
der gleichen Menge Chloroform 30 Minuten bei 80 °C er-
hitzt. Die Sporen wurden auf LB-Agarplatten ausplat-
15 tiert und 2 Tage bei 25 °C inkubiert. Mutanten, die un-
ter diesen Selektionsbedingungen wachsen konnten, wur-
den isoliert.

3. Klonierung und Sequenzierung der *secA* Gene der 20 Suppressormutanten

B. subtilis DB 104 wurde verwendet, um zu unterschei-
den, ob die supprimierenden Mutationen der Suppressor-
mutanten im *secA* Gen von *S. carnosus* oder einem anderen
25 Gen von *B. subtilis* lokalisiert sind. Hierzu wurde *B.*
subtilis DB 104 mit chromosomaler DNA der Suppressormu-
tanten transformiert und Chloramphenicol resistente
Klone selektioniert. Die so erhaltenen Transformanten
wurden getestet, ob sie auch bei 25 °C wachsen können,
30 somit außer dem Gen für die Chloramphenicol Ace-
tyltransferase auch das benachbarte, stromabwärts lie-
gende *S. carnosus secA* Gen mit der supprimierenden Mu-

tation anstelle des *B. subtilis secA* Gens in das Chromosom integriert hatten. Es wurde festgestellt, dass die supprimierenden Mutationen der Suppressormutanten im *secA* Gen von *S. carnosus* lokalisiert sind. Daher
5 wurde anschließend eine Klonierung der *secA* Gene durchgeführt.

Um die *S. carnosus secA* Gene der Suppressormutanten unter der Kontrolle des Xylose induzierbaren Promotors
10 *xylA* zu klonieren, erfolgte eine Amplifizierung von *secA* mittels PCR unter Verwendung chromosomaler DNA der Suppressormutanten als Matrize. Hierfür wurden die Primer

SecAS.c.NBamH1 (5' CGGGATCCCAAAGGAGCGAACAGAATGGG 3')
15 SecAS.c.CSph1 (5' ACATGCATGCATACAACCTTACTATTTACCGCAGC
3') verwendet (unterstrichene Basen zeigen die BamH1 bzw. Sph1 Schnittstelle an). Nach Amplifikation wurde ein 2,56 kb Fragment erhalten, welches mit BamH1 und Sph1 verdaut wurde und in den ebenfalls BamH1/Sph1 ver-
20 dauten Vektor pWH1520 [17] ligiert wurde, wodurch die Plasmide pWHsecAS.c._{supp.} erhalten wurden. Die Sequenzierung der *secA* Gene erfolgte mit IRD800 markierten Primern

SecAS.c. H1 (5' AACTGCAACGATGCCGAC 3'),
25 SecAS.c.H2 (5' GTGCTGATAAAGCTGAACG 3')
SecA S.c.H3 (5' AATTCCAACGAACCGTCC 3'),
SecAS.c.H4 (5' GACAAGGTGACCGCGGAG 3'),
SecAS.c.H5 (5' AAGGTAAAGATCGTGAGG 3') und
SecAS.c.R5 (5' CTGTTCAAGTTCAATCCG 3') (MWG) unter Ver-
30 wendung des Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers.

4. Transfer supprimierender Mutationen in das SecA von *B. subtilis*

- 5 Die Übertragung supprimierender Mutationen im SecA von *S. carnosus* auf die entsprechenden Aminosäurereste im SecA von *B. subtilis* erfolgte mittels ortsgerichteter Mutagenese von plasmidkodiertem *B. subtilis* SecA unter Verwendung des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit
- 10 von Stratagene nach Angaben des Herstellers. Als Matrixze für die PCR Reaktion wurde das Plasmid pMKL40 und folgende Primerpaare zum Einfügen der gewünschten Mutationen verwendet (die veränderten Basen sind unterstrichen):
- 15 1. Austausch von Histidin zu Glutamin an Aminosäureposition 464
- 5' GTGTTAAATGCCAAAACCAAGAACGTGAAGCGCAGATC 3'
- 5' GATCTGCGCTTCACGTTCTTGGTTTTTGGCATTTAACAC 3'
- 20 2. Austausch von Alanin zu Valin an Position 468
- 5' CCATGAACGTGAAGTTCAGATCATTGAAGAGGCCGGCC 3'
- 5' GGCCGGCCTCTTCAATGATCTGAACTTCACGTTTCATGG 3'
3. Austausch von Alanin zu Valin an Position 487
- 25 5' CGATTGCGACTAACATGGTTGGGCGCGGAACGG 3'
- 5' CCGTTCCGCGCCCAACCATGTTAGTCGCAATCG 3'
4. Austausch von Asparaginsäure zu Alanin an Position 531
- 30 5' CCGGACGTCAGGGAGCCCCGGGGATTACTC 3'
- 5' GAGTAATCCCCGGGGCTCCCTGACGTCCGG 3'

5. Austausch von Asparaginsäure zu Valin an Position 729

5' GGATGGATCATATTGTTGCGATGGATCAGCTCCGCCAAGGG 3'

5' CCCTTGGCGGAGCTGATCCATCGCAACAATATGATCCATCC 3'

5

Ein 1,86 kb SnaB1/Sph1 *secA* Fragment aus pMKL40, in welchem die gewünschte Mutation vorhanden war, wurde anschließend mit dem 8,67 kb Fragment des mit SnaB1 und Sph1 verdauten Vektors pWMKL1 ligiert. Daraus entstanden die Plasmide pWAX (X steht für eines der Konstrukte 464, 468, 487, 531 bzw. 729), welche die *secA* Gene mit den gewünschten Mutationen in einem *B. subtilis* Expressionsvektor unter der Kontrolle des Xylose induzierbaren Promotors *pxylA* enthielten. Die Sequenzierung der veränderten *B. subtilis secA* Gene erfolgte mit den Primern

SecAB.s.H1 (5' GTACAGCTAAGACAGAGG 3'),
 SecAB.s.H2 (5' TTGACCGCTTCGGCATGG 3'),
 SecAB.s.H3 (5' AAGGGATTACCTTCGTGC 3'),
 20 SecAB.s.R1 (5' TTTCCTTCCATCGTGCGG 3'),
 SecAB.s.R2 (5' TTCAGTAAGCTGTACAGC 3') und
 SecAB.s.R3 (5' TTTCCGTC ATGAAGCGCC 3').

Die Expression der SecA Proteine wurde überprüft, indem LB Medium nach Zugabe von 0,2 % (w/v) Xylose mit den Stämmen *B. subtilis* DB104, welche die Plasmide pWA_x enthielten, zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angeimpft wurde und anschließend 4 Stunden bei 37 °C inkubiert wurde. Zellen aus 2 ml Kultur wurden abzentrifugiert und nach Aufschluß mit 50 µl Lysispuffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 25 mM MgCl₂, 200 mM NaCl, 5 mg/ml Lysozym) in dem gleichen Volumen 2 × Laemmli Probenpuffer aufgekocht. Die Proteine wurden in einem 10 % SDS Polyacrylamidgel auf-

getrennt und das SecA mittels Western-Blot Analyse unter Verwendung von *B. subtilis* SecA spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Funktionalität der veränderten *B. subtilis* SecA Proteine wurde überprüft, indem
5 die temperatursensitive *B. subtilis* *secA* Mutante NIG1152 (*met*, *his*, *div341^{ts}*) [18] mit den Plasmiden pWAX transformiert wurde und durch Induktion der SecA Expression mit 0,2 % (w/v) Xylose der Wachstumsdefekt der Mutante bei der nicht-permissiven Temperatur von 42
10 °C komplementiert wurde.

5. Untersuchung des Proteinexports einer alkalischen Phosphatase PhoB

Es wurde untersucht, ob durch Expression der veränderten *B. subtilis* SecA Proteine der Proteinexport im *B. subtilis* Wildtyp verbessert wird. Als Exportsubstrat wurde eine Variante der alkalischen Phosphatase PhoB verwendet, die aufgrund eines Aminosäureaustausches von Leucin zu Glutamin an Position 15 (PhoBL15Q) in der Signalsequenz nur sehr ineffizient im *B. subtilis* Wildtyp exportiert wird. *B. subtilis* DB104 wurde mit den Plasmiden pCU3phoB bzw. pCU3phoBL15Q, welche die Gene für das Wildtyp PhoB bzw. die Variante PhoBL15Q enthalten, sowie den Plasmiden pWAX., welche die veränderten *secA B. subtilis* Gene enthalten, transformiert. Mit den so erhaltenen Stämmen wurde LB Medium, mit 0,5 mM IPTG und 0,2 % Xylose versetzt, zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angeimpft und die Kulturen 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. 2 ml Zellen wurden durch Zentrifugation vom Überstand getrennt, mit 50 µl Lysispuffer aufgeschlossen und in dem gleichen Volumen 2× Laemmli Probenpuffer aufgekocht.

Proteine aus den Überständen wurden über Nacht mit 13 % Trichloressigsäure bei 4 °C gefällt, zweimal mit 80 % Azeton gewaschen und in 50 µl Laemmli Probenpuffer aufgekocht. Von den Zellextrakten wurde ein Volumen entsprechend 0,2 OD Zellen und von den Überständen ein Volumen entsprechend 1,0 OD Zellen auf ein 12,5 % SDS Polyacrylamidgel aufgetragen und das PhoB mittels PhoB spezifischer Antikörper im Western-Blot nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigt Fig. 3.

Literatur

1. Harwood C.R. (1992): *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotechnol.* 10: 247-256
2. Simonen M., Palva I. (1993): Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiol. Rev.* 57: 109- 137
3. Freudl, R. (1992) Protein secretion in Gram-positive bacteria. *J. Biotechnol.* 23: 231-240.
- 10 4. Freudl, R. (1998) Proteinsekretion bei Gram-positiven Bakterien: Molekulare Grundlagen und biotechnologische Aspekte. *Biospektrum* 4 (no. 1): 29-33.
- 15 5. van Wely, Karel H. M.; Swaving, Jelto; Freudl, Roland, Driessen, Arnold J. M. (2001) Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 437-454.

6. Fekkes, P.; Driessen, A. J. M. (1999) Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 161-173.
7. Nakatogawa, H., Mori, H., und Ito, K. (2000) Two independent mechanisms down-regulate the intrinsic SecA ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 275: 33209-33212.
8. Sianidis, G., Karamanou, S., Vrontou, E., Boulias, K., Repanas, K., Kyrpides, N., Politou, AS., und Economou, A. (2001) Cross-talk between catalytic and regulatory elements in a DEAD motor domain is essential für SecA function. *EMBOJ.* 20: 961-970.
9. Baud, C., Karamanou, S., Sianidis, G., Vrontou, E., Politou, A. and Economou, A. (2002) Allosteric communication between signal peptides and the SecA protein DEAD Motor ATPase domain. *J. Biol. Chem.* 277: 13724-13731.
10. Matsumoto, G., Nakatogawa, H., Mori, H., und Ito, K. (2000) Genetic dissection of SecA: suppressor mutations against the *secY* translocase defect. *Genes to Cells* 5: 991-999.
11. Klose, M., Schimz, K.L., van der Wolk, J., Driessen, A.J.M., Freudl, R. (1993) Lysine 106 of the putative ATP-binding site of *Bacillus subtilis* SecA protein is required for functional complementation of *Escherichia coli* *secA* mutants in vivo. *J. Biol. Chem.* 268: 4504-4510

12. Overhoff, B., Klein, M., Spies, M., Freudl, R.
(1991) Identification of a gene fragment which codes
for the 364 amino-terminal amino acid residues of a
SecA homologue from *Bacillus subtilis*: further evi-
5 dence for the conservation of the protein export ap-
paratus in gram-positive and gram-negative bacteria.
Mol. Gen. Genet. 228: 417-423
13. Antoniewski, C., Savelli, B., Stragier, P. (1990)
The *spoIIJ* gene, which regulates early developmental
10 steps in *Bacillus subtilis* belongs to a class of en-
vironmentally responsive genes. *J. Bacteriol.* 172:
86-93
14. Klein, M., Meens J., Freudl R. (1995) Functional
characterization of the *Staphylococcus carnosus* SecA
15 protein in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*
secA mutant strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 131: 271-
277
15. Kawamura, F., Doi, R.H. (1984) Construction of a
Bacillus subtilis double mutant deficient in extra-
20 cellular alkaline and neutral protease. *J. Bacte-
riol.* 160: 442-444
16. Schaeffer, P., Millet, J., Auber, J.P. (1965) Cata-
bolic repression of bacterial sporulation. *Proc.*
Natl. Acad. Sci. USA 54: 704-711
- 25 17. Rygus, T., Hillen, W. (1991) Inducible high-level
expression of heterologous genes in *Bacillus megate-
rium* using the regulatory elements of the xylose-

utilization operon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35:
594-599

18.Miyakawa, Y., Komano, T. (1981) Study of the cell
cycle of *Bacillus subtilis* using temperature-
5 sensitive mutants. Isolation and genetic analysis of
the mutants defective in septum formation. *Mol. Gen.*
Genet. 181: 207-214

19.Meens, J., Frings, E., Klose, M., und Freudl, R.
(1993) An outer membrane protein (OmpA) of *Escher-*
10 *ichia coli* can be translocated across the cytoplas-
mic membrane of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*
9: 847-855

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. SecA Protein (Translokations-ATPase) mit einer Aminosäuresequenz, welches gegenüber der Wild Typ SecA Aminosäuresequenz mindestens eine Veränderung der Aminosäuresequenz aufweist oder eine modifizierte Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon, wodurch ein SecA mit erhöhter Sekretion für Proteine ausgebildet wird.
5
2. SecA nach Anspruch 1, welches im Bereich der Aminosäuren, die für die Ausbildung der regulatorischen Elemente IRA-1 und/oder IRA-2 verantwortlich sind, mindestens eine Veränderung aufweist oder eine modifizierte Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon.
10
3. Polypeptide nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus gram positiven oder gram negativen Bakterien stammen.
15
4. Polypeptide nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus Bacillaceae, Staphylococcaceae, Enterobacteriaceae oder Corynebacteriaceae stammen.
20
5. Polypeptide nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus Bacillus, Staphylococcus, Escherichia oder Corynebacterium stammen.
25

6. Polypeptide nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie aus *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheni-*
formis, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Staphylococcus*
5 *carnosus*, *Escherichia coli* oder *Corynebacterium*
glutamicum stammen.
7. SecA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, welches aus
Staphylococcus carnosus isoliert wurde und im Be-
reich der Aminosäuren von Position 198 bis 772 min-
10 destens eine Veränderung aufweist oder eine modifi-
zierte Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isofor-
men davon.
8. SecA gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, welches aus
Bacillus subtilis isoliert wurde und im Bereich der
15 Aminosäuren von Position 442 bis 767 mindestens ei-
ne Veränderung aufweist oder eine modifizierte Form
dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon.
9. SecA nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
mit einer Aminosäuresequenz,
20 gemäß SEQ ID No 2, welches mindestens eine Verände-
rung aus der Gruppe der Aminosäuren in Position
198, 470, 474, 493, 537, 665 und/oder 734 aufweist
oder eine modifizierte Form dieser Polypeptidse-
quenzen oder Isoformen davon.
- 25 10. SecA nach einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie 8,
mit einer Aminosäuresequenz,
gemäß SEQ ID No 4, welches mindestens eine Verände-
rung aus der Gruppe der Aminosäuren in Position
464, 468, 487, 531 und/oder 729 aufweist oder eine

modifizierte Form dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.

11. Nukleinsäure codierend für ein SecA mit erhöhter Sekretion für Proteine, enthaltend eine Gensequenz
5 *secA*, welche im *secA* Gen mindestens eine Mutation aufweist oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser hybridisierende Nukleotidsequenzen.
12. Nukleinsäure gemäß Anspruch 11, welche im Bereich
10 der Nukleotide, die für die regulatorischen Elemente IRA-1 und/oder IRA-2 codieren, mindestens eine Mutation aufweist oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser hybridisierende Nukleotidsequenzen.
13. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 11 bis 12,
15 dadurch gekennzeichnet,
dass sie aus gram-positiven oder gram-negativen Bakterien isoliert wird.
14. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 11 bis 13,
20 dadurch gekennzeichnet,
dass sie aus Bacillaceae, Staphylococcaceae, Enterobacteriaceae oder Corynebacteriaceae isoliert wird.
15. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 11 bis 14,
25 dadurch gekennzeichnet,
dass sie aus Bacillus, Staphylococcus, Escherichia oder Corynebacterium isoliert wird.
16. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 11 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,

dass sie aus *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Staphylococcus carnosus*, *Escherichia coli* oder *Corynebacterium glutamicum* isoliert wird.

- 5 17. Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 11 bis 16,
enthaltend ein Gen *secA*, welche aus *Staphylococcus*
carnosus isoliert wurde und im Bereich der Nukleo-
tide in Position 592 bis 2210 mindestens eine Muta-
tion aufweist oder ein Allel, Homolog oder Derivat
10 dieser Nukleotidsequenzen oder mit diesen hybridi-
sierende Nukleotidsequenzen.
18. Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 11 bis 16,
enthaltend ein Gen *secA*, welche aus *Bacillus subti-*
lis isoliert wurde und im Bereich der Nukleotide in
15 Position 1392 bis 2186 mindestens eine Mutation
aufweist oder ein Allel, Homolog oder Derivat die-
ser Nukleotidsequenzen oder mit diesen hybridisie-
rende Nukleotidsequenzen.
19. Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 11 bis 17,
20 enthaltend ein Gen *secA* gemäß SEQ ID No 1, welche
mindestens eine Mutation aus der Gruppe der Nukleo-
tide in Position 592, 1410, 1421, 1478, 1610, 1994
und/oder 2210 aufweist oder ein Allel, Homolog oder
Derivat dieser Nukleotidsequenzen oder mit diesen
25 hybridisierende Nukleotidsequenzen.
20. Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 11 bis 16
sowie 18, enthaltend ein Gen *secA* gemäß SEQ ID No
3, welche mindestens eine Mutation aus der Gruppe
der Nukleotide in Position 1392, 1403, 1404, 1460,
30 1461, 1592 und/oder 2186 aufweist oder ein Allel,

Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenzen oder mit diesen hybridisierende Nukleotidsequenzen.

21. Genstruktur enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß den Ansprüchen 11 bis 20 sowie mit diesen operativ verknüpfte regulatorische Sequenzen.
22. Vektor enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 11 bis 20 oder eine Genstruktur gemäß Anspruch 21 sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur Selektion, zur Replikation in der Wirtszelle oder zur Integration in das Wirtszell-Genom.
23. Mikroorganismus enthaltend wenigstens eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 11 bis 20 in replizierbarer Form.
24. Mikroorganismus gemäß Anspruch 23 enthaltend in replizierbarer Form eine Genstruktur gemäß Anspruch 21 oder einen Vektor gemäß Anspruch 22.
25. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 23 bis 24 enthaltend wenigstens ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 bis 10, welches ein im Vergleich zu dem entsprechenden Wild Typ Stamm SecA Protein mit erhöhter Sekretion für Proteine aufweist.
26. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 23 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass er ein gram positives oder gram negatives Bakterium ist.
27. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 23 bis 26, dadurch gekennzeichnet,

dass er zur Familie der Bacillaceae, Staphylococcaceae, Enterobacteriaceae oder Corynebacteriaceae gehört.

28. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 23 bis
5 27,

dadurch gekennzeichnet,

dass er zur Gattung Bacillus, Staphylococcus, Escherichia oder Corynebacterium gehört.

29. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 23 bis
10 28,

dadurch gekennzeichnet,

dass er zu Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens, Staphylococcus carnosus, Escherichia coli oder Corynebacterium glutamicum gehört.
15

30. Sonde zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen codierend für an der Sekretion von Proteinen beteiligten Proteinen,
dadurch gekennzeichnet,
20 dass sie ausgehend von Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 11 bis 20 hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete Markierung enthält.

31. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Proteinen,
25 dadurch gekennzeichnet, dass

a) wenigstens eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 11 bis 20 isoliert aus einem gram positiven oder gram negativen Bakterium in einen

Mikroorganismus übertragen oder dort erzeugt wird und diese dort exprimiert wird,

5 b) dieser genetisch veränderte Mikroorganismus aus Schritt a) zur mikrobiellen Herstellung von Proteinen eingesetzt wird und

c) das entsprechend gebildete Protein aus dem Kulturmedium isoliert wird.

32. Verfahren nach Anspruch 31,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass das Protein ein homologes oder heterologes Protein ist.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 32,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Protein ein Hormon, Enzym, Wachstumsfaktor, Pharmaprotein oder Cytokin ist.
15

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 33,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Enzym eine Protease, Amylase, Carbohyd-
rase, Lipase, Epimerase, Tautomerase, Mutase, Trans-
20 ferase, Kinase oder Phosphatase ist.

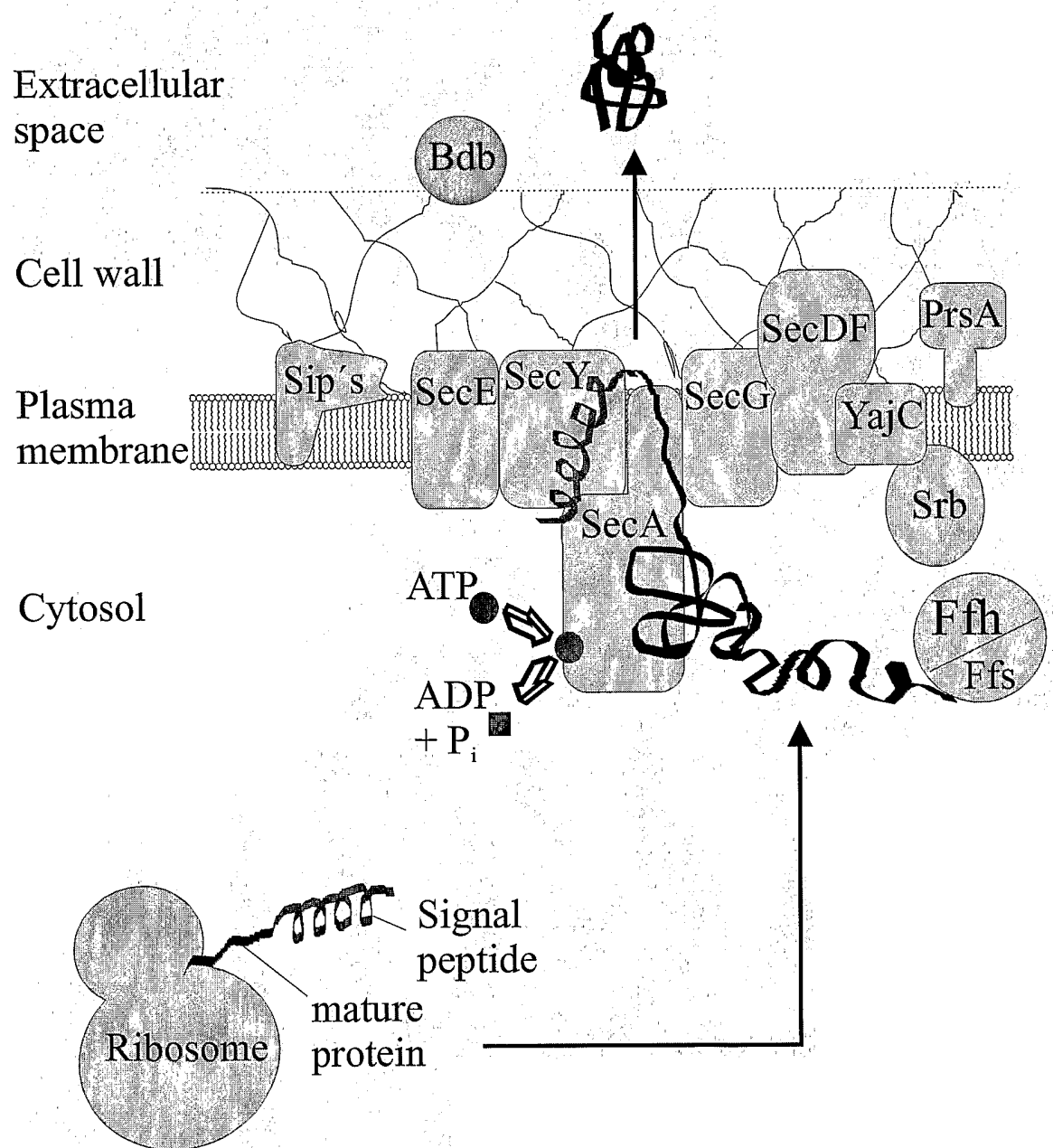


Fig. 1

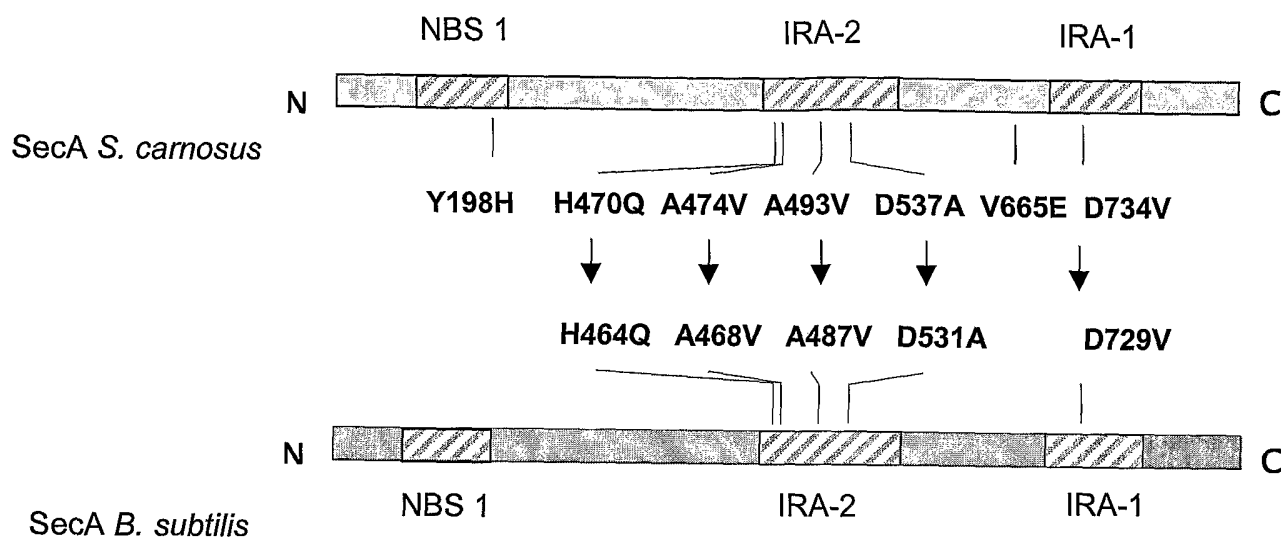


Fig. 2

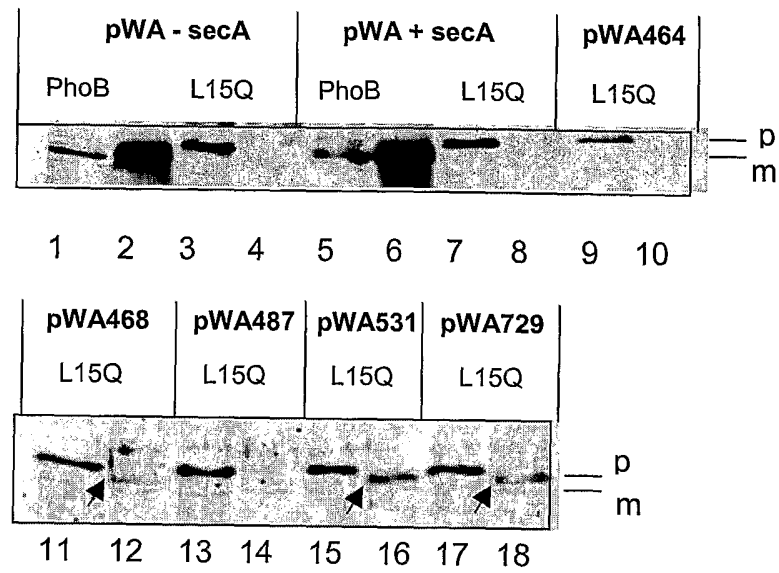


Fig. 3

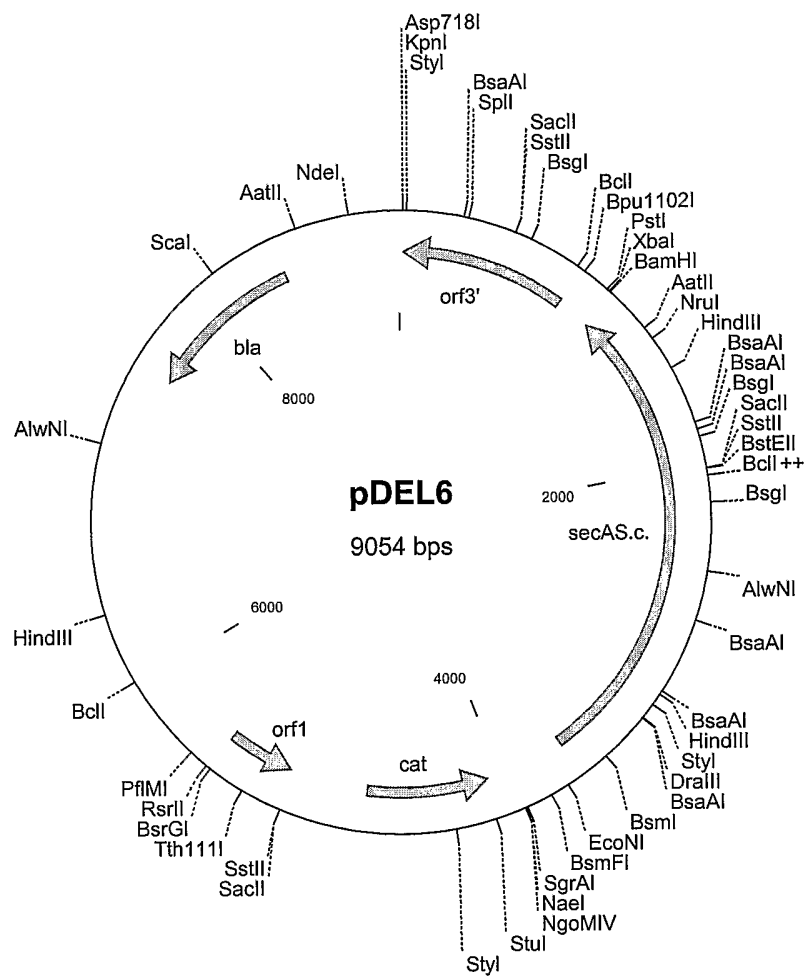


Fig. 4

5/7

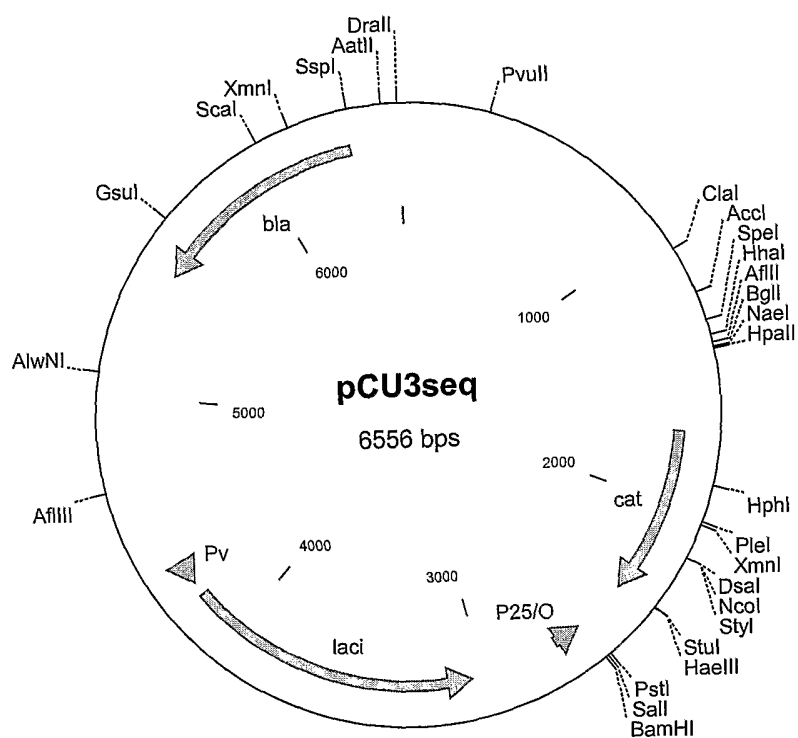


Fig. 5

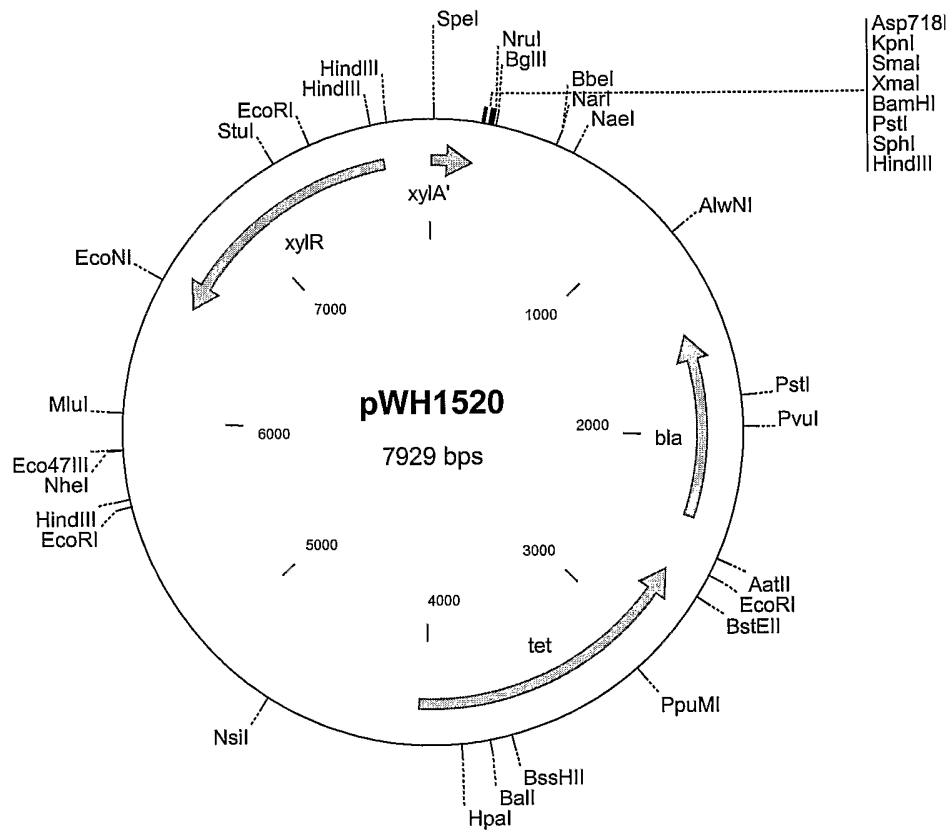


Fig. 6

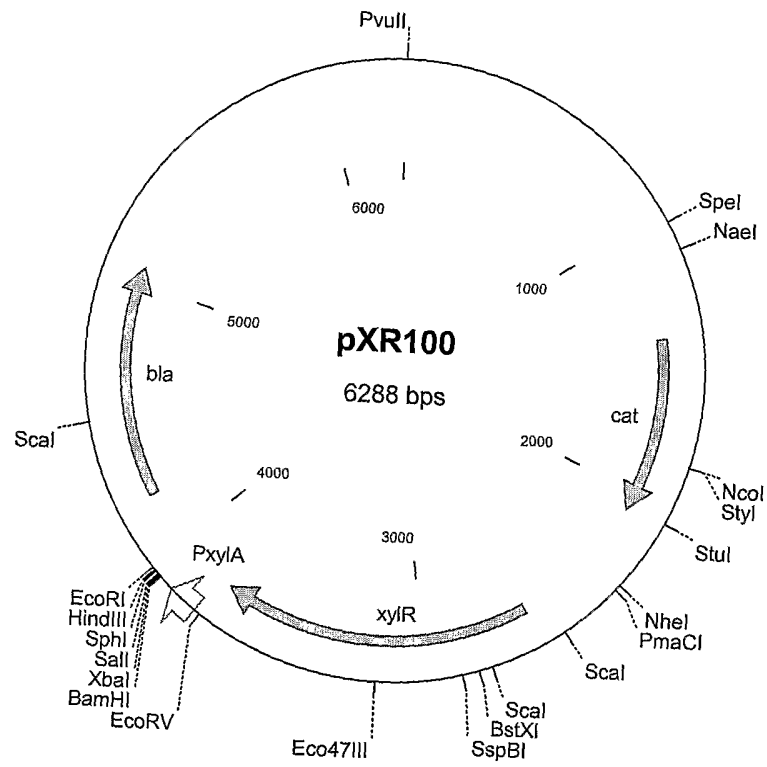


Fig. 7

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forschungszentrum Jülich GmbH

<120> Bakterien mit erhöhter Proteinsekretion

<130> PT 1.2076

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2535

<212> DNA

<213> Staphylococcus carnosus

<400> 1

```
atggggttttt taacaaaaat tgttgacggc aataagagag aaatcaaacg cctaagtaag 60
caagctgaca aagtaatctc attagaagaa gaaatgtcaa ttcttactga tgaagaaatt 120
agaaataaaaa caaaagcatt ccaagaaaga ttgcaagcag aagaagatgt aagcaaacaa 180
gataaaatatt tagaagaaat attacctgaa gcatttgccg ttgtccgtga aggagctaaa 240
cgtgtatttta atatgacacc ttatccagtt caaatcatgg gtggtatcgc cattcataat 300
ggtgacatttt cagaaatgag aacagggtgaa ggtaaaacat taactgcaac gatgccgact 360
tattttaaacg ccttagcagc acgtgggtgtg catgttatta cagtcaatga atacttggca 420
agttctcaaa gagaagaaat ggccgagttt tataatattcc ttggttttatc agtcggattg 480
aacttgaaca gcttatcaac agaacaaaag cgtgaagctt ataatgcaga tattacgtat 540
agtacaaata atgaattagg cttcgactat ttacgcgata acatgggtgaa ttattcagaa 600
gaacgtgtta tgcgtccgct tcatttccgct atcattgatg aggtccgactc tattttaatc 660
gatgaagcgc gtacaccatt gattatttca ggggaagctg aaaaatcaac atctctttat 720
acacaagcaa atgttttccg taaaatgtta aaagcagaag atgattataa ttatgatgaa 780
aaaacaaaat cagtacaatt aacagatcaa ggtgctgata aagctgaacg tatgttcaag 840
ttagataact tatatgattt gaaaaacgtt gatattatca cgcatatcaa tacagcatta 900
cgtgctaact atacattgca acgcgatgta gattacatgg ttgtagatgg agaagtattg 960
attgtcgacc aatttacagg tgaacaatg ccaggtcgtc gattctctga aggacttcac 1020
caagcgattg aggctaaaga aggggttcaa attcaaatg aatctaaaac aatggccttct 1080
atcacattcc aaaactactt ccgtatgtat aataaattag ccggtatgac aggtactgct 1140
aaaacagagg aagaagaatt ccgtaacatt tataatatga cagttacaca aattccaacg 1200
aaccgctcctg ttcaacgtga agatagacct gacttgattt tcatcagcca aaaaggcaag 1260
ttcgatgctg ttgttgaaga tgttgttgaa aaacataaaa aaggccaacc aattctttta 1320
ggtagctgtag cgttgaaac aagtgaatac atttcacaac tattgaaaaa acgcgggtgtg 1380
cgtcatgatg tcttaaacgc taaaaaccat gaacgcgaag ctgaaatcgt atctacagca 1440
ggtaaaaaag gtgcagtcac aatcgcaaca aacatggctg gtcgtggtac cgatattaaa 1500
ttaggcgaag gtgttgaaga attagggcgg cttgctgtta ttggtacaga acgtcatgaa 1560
tcacgccgta tcgatgatca gttgcgtggg cgttctggac gacaagggtg ccgcggagaa 1620
```

```

agccggtttct atttatcatt acaagatgag ttgatggtag gtttcgggtc tgaacgtctg 1680
caaaaaatga tgggccgatt aggtatggat gactctacac cgattgaatc aaaaatggta 1740
tctcgagctg ttgaatctgc acaaaaacgt gttgaaggta acaacttcga tgcacgtaaa 1800
cgtatcttag aatacagatga agttttacgt aaacaacgtg aaatcattta tggatgaacgt 1860
aataatatta tgcattcaga atcaagttct gaattagtca ttacaatgat acgctctaca 1920
ttagatcgtg caatcagtta ttatgtaa atgaagaattgg aagaaattga ctatgcgccg 1980
tttattaatt ttgtggaaga tgttttcttg cacgaagggtg aagtcaaaga agatgaaatc 2040
aaaggtaaag gtaaagatcg tgaggatatt ttcgatacag tatgggctaa aattgaaaaa 2100
gcttatgaag caaaaaagc caatataccg gaccaattca atgaattcga acgtatgatt 2160
ttattacgtt ctattgatgg aagatggaca gaccatatcg atacaatgga tcaattacgt 2220
caaggatatcc atttacgttc atacgggtcaa caaaacccac ttcgcgacta tcaaatgaa 2280
gggcaccaac tatttgatag aatgatgggtc aatattgaag aagacgtcag caaatatatc 2340
ttgaaatcaa ttatcacagt agatgatgat attgaacgtg ataaagcaaa agaatatcaa 2400
ggacaacatg tatcagctga agatggaaaa gaaaaagtaa aaccgcaacc agttgttaaa 2460
gataatcaca tcggaagaaa tgatccttgt ccatgcggca gcggtaaaaa gtataaaaat 2520
tgctgcggta aatag 2535

```

<210> 2

<211> 844

<212> PRT

<213> Staphylococcus carnosus

<400> 2

```

Met Gly Phe Leu Thr Lys Ile Val Asp Gly Asn Lys Arg Glu Ile Lys
  1              5              10              15

```

```

Arg Leu Ser Lys Gln Ala Asp Lys Val Ile Ser Leu Glu Glu Glu Met
      20              25              30

```

```

Ser Ile Leu Thr Asp Glu Glu Ile Arg Asn Lys Thr Lys Ala Phe Gln
    35              40              45

```

```

Glu Arg Leu Gln Ala Glu Glu Asp Val Ser Lys Gln Asp Lys Ile Leu
    50              55              60

```

```

Glu Glu Ile Leu Pro Glu Ala Phe Ala Leu Val Arg Glu Gly Ala Lys
    65              70              75              80

```

```

Arg Val Phe Asn Met Thr Pro Tyr Pro Val Gln Ile Met Gly Gly Ile
      85              90              95

```

```

Ala Ile His Asn Gly Asp Ile Ser Glu Met Arg Thr Gly Glu Gly Lys
    100             105             110

```

```

Thr Leu Thr Ala Thr Met Pro Thr Tyr Leu Asn Ala Leu Ala Ala Arg
    115             120             125

```

Gly Val His Val Ile Thr Val Asn Glu Tyr Leu Ala Ser Ser Gln Arg
 130 135 140

Glu Glu Met Ala Glu Leu Tyr Asn Phe Leu Gly Leu Ser Val Gly Leu
 145 150 155 160

Asn Leu Asn Ser Leu Ser Thr Glu Gln Lys Arg Glu Ala Tyr Asn Ala
 165 170 175

Asp Ile Thr Tyr Ser Thr Asn Asn Glu Leu Gly Phe Asp Tyr Leu Arg
 180 185 190

Asp Asn Met Val Asn Tyr Ser Glu Glu Arg Val Met Arg Pro Leu His
 195 200 205

Phe Ala Ile Ile Asp Glu Val Asp Ser Ile Leu Ile Asp Glu Ala Arg
 210 215 220

Thr Pro Leu Ile Ile Ser Gly Glu Ala Glu Lys Ser Thr Ser Leu Tyr
 225 230 235 240

Thr Gln Ala Asn Val Phe Ala Lys Met Leu Lys Ala Glu Asp Asp Tyr
 245 250 255

Asn Tyr Asp Glu Lys Thr Lys Ser Val Gln Leu Thr Asp Gln Gly Ala
 260 265 270

Asp Lys Ala Glu Arg Met Phe Lys Leu Asp Asn Leu Tyr Asp Leu Lys
 275 280 285

Asn Val Asp Ile Ile Thr His Ile Asn Thr Ala Leu Arg Ala Asn Tyr
 290 295 300

Thr Leu Gln Arg Asp Val Asp Tyr Met Val Val Asp Gly Glu Val Leu
 305 310 315 320

Ile Val Asp Gln Phe Thr Gly Arg Thr Met Pro Gly Arg Arg Phe Ser
 325 330 335

Glu Gly Leu His Gln Ala Ile Glu Ala Lys Glu Gly Val Gln Ile Gln
 340 345 350

Asn Glu Ser Lys Thr Met Ala Ser Ile Thr Phe Gln Asn Tyr Phe Arg
 355 360 365

Met Tyr Asn Lys Leu Ala Gly Met Thr Gly Thr Ala Lys Thr Glu Glu
 370 375 380

Glu Glu Phe Arg Asn Ile Tyr Asn Met Thr Val Thr Gln Ile Pro Thr
 385 390 395 400
 Asn Arg Pro Val Gln Arg Glu Asp Arg Pro Asp Leu Ile Phe Ile Ser
 405 410 415
 Gln Lys Gly Lys Phe Asp Ala Val Val Glu Asp Val Val Glu Lys His
 420 425 430
 Lys Lys Gly Gln Pro Ile Leu Leu Gly Thr Val Ala Val Glu Thr Ser
 435 440 445
 Glu Tyr Ile Ser Gln Leu Leu Lys Lys Arg Gly Val Arg His Asp Val
 450 455 460
 Leu Asn Ala Lys Asn His Glu Arg Glu Ala Glu Ile Val Ser Thr Ala
 465 470 475 480
 Gly Gln Lys Gly Ala Val Thr Ile Ala Thr Asn Met Ala Gly Arg Gly
 485 490 495
 Thr Asp Ile Lys Leu Gly Glu Gly Val Glu Glu Leu Gly Gly Leu Ala
 500 505 510
 Val Ile Gly Thr Glu Arg His Glu Ser Arg Arg Ile Asp Asp Gln Leu
 515 520 525
 Arg Gly Arg Ser Gly Arg Gln Gly Asp Arg Gly Glu Ser Arg Phe Tyr
 530 535 540
 Leu Ser Leu Gln Asp Glu Leu Met Val Arg Phe Gly Ser Glu Arg Leu
 545 550 555 560
 Gln Lys Met Met Gly Arg Leu Gly Met Asp Asp Ser Thr Pro Ile Glu
 565 570 575
 Ser Lys Met Val Ser Arg Ala Val Glu Ser Ala Gln Lys Arg Val Glu
 580 585 590
 Gly Asn Asn Phe Asp Ala Arg Lys Arg Ile Leu Glu Tyr Asp Glu Val
 595 600 605
 Leu Arg Lys Gln Arg Glu Ile Ile Tyr Gly Glu Arg Asn Asn Ile Ile
 610 615 620
 Asp Ser Glu Ser Ser Ser Glu Leu Val Ile Thr Met Ile Arg Ser Thr
 625 630 635 640

Leu Asp Arg Ala Ile Ser Tyr Tyr Val Asn Glu Glu Leu Glu Glu Ile
645 650 655

Asp Tyr Ala Pro Phe Ile Asn Phe Val Glu Asp Val Phe Leu His Glu
660 665 670

Gly Glu Val Lys Glu Asp Glu Ile Lys Gly Lys Gly Lys Asp Arg Glu
675 680 685

Asp Ile Phe Asp Thr Val Trp Ala Lys Ile Glu Lys Ala Tyr Glu Ala
690 695 700

Gln Lys Ala Asn Ile Pro Asp Gln Phe Asn Glu Phe Glu Arg Met Ile
705 710 715 720

Leu Leu Arg Ser Ile Asp Gly Arg Trp Thr Asp His Ile Asp Thr Met
725 730 735

Asp Gln Leu Arg Gln Gly Ile His Leu Arg Ser Tyr Gly Gln Gln Asn
740 745 750

Pro Leu Arg Asp Tyr Gln Asn Glu Gly His Gln Leu Phe Asp Thr Met
755 760 765

Met Val Asn Ile Glu Glu Asp Val Ser Lys Tyr Ile Leu Lys Ser Ile
770 775 780

Ile Thr Val Asp Asp Asp Ile Glu Arg Asp Lys Ala Lys Glu Tyr Gln
785 790 795 800

Gly Gln His Val Ser Ala Glu Asp Gly Lys Glu Lys Val Lys Pro Gln
805 810 815

Pro Val Val Lys Asp Asn His Ile Gly Arg Asn Asp Pro Cys Pro Cys
820 825 830

Gly Ser Gly Lys Lys Tyr Lys Asn Cys Cys Gly Lys
835 840

<210> 3

<211> 2526

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 3

atgcttgga ttttaaataa aatgtttgat ccaacaaaac gtacgctgaa tagatacgaa 60

```

aaaattgcta acgatattga tgcgattcgc ggagactatg aaaatctctc tgacgacgca 120
ttgaaacata aaacaattga attttaaagag cgtcttgaaa aaggggcgac aacggatgat 180
cttcttgttg aagctttcgc tgttggtcga gaagcttcac gccgcgtaac aggcatgttt 240
ccgtttaaag tccagctcat ggggggcgtg gcgcttcacg acggaatat agcggaaatg 300
aaaacagggg aagggaaaac attaacgtct accctgcctg tttattttaa tgcggttaacc 360
ggtaaaggcg tacacgtcgt gactgtcaac gaatacttgg caagccgtga cgctgagcaa 420
atggggaaaa ttttcgagtt tctcggtttg actgtcgggt tgaattttaa ctcaatgtca 480
aaagacgaaa aacgggaagc ttatgccgct gatattactt actccacaaa caacgagctt 540
ggcttcgact atttgcgtag caatatggtt ctttataaag agcagatggt tcagcgcccc 600
cttcattttg cggtaataga tgaagttgac tctattttta ttgatgaagc aagaacaccg 660
cttatcattt ctggacaagc tgcaaaatcc actaagctgt acgtacaggc aaatgctttt 720
gtccgcacgt taaaagcggg gaaggattac acgtacgata tcaaaacaaa agctgtacag 780
cttactgaag aaggaatgac gaaggcggaa aaagcattcg gcatcgataa cctctttgat 840
gtgaagcatg tcgcgctcaa ccaccatata aaccaggcct taaaagctca cgttgcgatg 900
caaaaggacg ttgactatgt agtgaagac ggacaggttg ttattgttga ttccttcacg 960
ggacgtctga tgaaaggccg ccgctacagt gaggggcttc accaagcgat tgaagcaaag 1020
gaagggcttg agattcaaaa cgaaagcatg accttggcga cgattacgtt ccaaaactac 1080
ttccgaatgt acgaaaaact tgccggtatg acgggtacag ctaagacaga ggaagaagaa 1140
ttccgcaaca tctacaacat gcaggttgtc acgatcccta ccaacaggcc tgttgtccgt 1200
gatgaccgcc cggatttaat ttaccgcacg atggaaggaa agtttaaggc agttgcggag 1260
gatgtcgcac agcgttacat gacgggacag cctgttctag tcggtacggg tgccggtgaa 1320
acatctgaat tgattttctaa gctgcttaaa aacaaaggaa ttccgcatca agtgttaaat 1380
gccaaaaacc atgaacgtga agcgcagatc attgaagagg ccggccaaaa aggcgcagtt 1440
acgattgcga ctaacatggc ggggcgcgga acggacatta agcttggcga aggtgtaaaa 1500
gagcttggcg ggctcgctgt agtcggaaca gaacgacatg aatcacgccg gattgacaat 1560
cagcttcgag gtcgttccgg acgtcaggga gacccgggga ttactcaatt ttatctttct 1620
atggaagatg aattgatgcg cagattcgga gctgagcgga caatggcgat gcttgaccgc 1680
ttcggcatgg acgactctac tccaatccaa agcaaaatgg tatctcgcg cggttgaatcg 1740
tctcaaaaaa gcgtcgaagg caataacttc gattcgcgta aacagcttct gcaatatgat 1800
gatgttctcc gccagcagcg tgaggtcatt tataagcagc gctttgaagt cattgactct 1860
gaaaacctgc gtgaaatcgt tgaaaatatg atcaagtctt ctctcgaacg cgcaattgca 1920
gcctatacgc caagagaaga gcttcctgag gagtgggaagc ttgacggtct agttgatctt 1980
atcaacacaa cttatcttga tgaaggtgca cttgagaaga gcgatatctt cggcaaagaa 2040
ccggatgaaa tgcttgagct cattatggat cgcacatca caaaatataa tgagaaggaa 2100
gagcaattcg gcaaagagca aatgcgcgaa ttcgaaaaag ttatcgttct tcgtgccgtt 2160
gattctaaat ggatggatca tattgatgcg atggatcagc tccgccaaag gattcacctt 2220
cgtgcttacg cgcagacgaa cccgcttcgt gagtatcaaa tggaaggttt tgcgatgttt 2280
gagcatatga ttgaatcaat tgaggacgaa gtcgcaaaat ttgtgatgaa agctgagatt 2340
gaaaacaatc tggagcgtga agaggttgta caaggtcaaa caacagctca tcagccgcaa 2400
gaaggcgacg ataacaaaaa agcaaagaaa gcaccgggtt gcaaagtggg tgatatcgga 2460
cgaaatgcc catgccactg cggaagcggg aaaaaatata aaaattgctg cggccgtact 2520
gaatag 2526

```

<210> 4

<211> 841

<212> PRT

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 4

Met Leu Gly Ile Leu Asn Lys Met Phe Asp Pro Thr Lys Arg Thr Leu
 1 5 10 15

Asn Arg Tyr Glu Lys Ile Ala Asn Asp Ile Asp Ala Ile Arg Gly Asp
 20 25 30

Tyr Glu Asn Leu Ser Asp Asp Ala Leu Lys His Lys Thr Ile Glu Phe
 35 40 45

Lys Glu Arg Leu Glu Lys Gly Ala Thr Thr Asp Asp Leu Leu Val Glu
 50 55 60

Ala Phe Ala Val Val Arg Glu Ala Ser Arg Arg Val Thr Gly Met Phe
 65 70 75 80

Pro Phe Lys Val Gln Leu Met Gly Gly Val Ala Leu His Asp Gly Asn
 85 90 95

Ile Ala Glu Met Lys Thr Gly Glu Gly Lys Thr Leu Thr Ser Thr Leu
 100 105 110

Pro Val Tyr Leu Asn Ala Leu Thr Gly Lys Gly Val His Val Val Thr
 115 120 125

Val Asn Glu Tyr Leu Ala Ser Arg Asp Ala Glu Gln Met Gly Lys Ile
 130 135 140

Phe Glu Phe Leu Gly Leu Thr Val Gly Leu Asn Leu Asn Ser Met Ser
 145 150 155 160

Lys Asp Glu Lys Arg Glu Ala Tyr Ala Ala Asp Ile Thr Tyr Ser Thr
 165 170 175

Asn Asn Glu Leu Gly Phe Asp Tyr Leu Arg Asp Asn Met Val Leu Tyr
 180 185 190

Lys Glu Gln Met Val Gln Arg Pro Leu His Phe Ala Val Ile Asp Glu
 195 200 205

Val Asp Ser Ile Leu Ile Asp Glu Ala Arg Thr Pro Leu Ile Ile Ser
 210 215 220

Gly Gln Ala Ala Lys Ser Thr Lys Leu Tyr Val Gln Ala Asn Ala Phe
 225 230 235 240

Val Arg Thr Leu Lys Ala Glu Lys Asp Tyr Thr Tyr Asp Ile Lys Thr

245	250	255
Lys Ala Val Gln Leu Thr Glu Glu Gly Met Thr Lys Ala Glu Lys Ala		
260	265	270
Phe Gly Ile Asp Asn Leu Phe Asp Val Lys His Val Ala Leu Asn His		
275	280	285
His Ile Asn Gln Ala Leu Lys Ala His Val Ala Met Gln Lys Asp Val		
290	295	300
Asp Tyr Val Val Glu Asp Gly Gln Val Val Ile Val Asp Ser Phe Thr		
305	310	315
Gly Arg Leu Met Lys Gly Arg Arg Tyr Ser Glu Gly Leu His Gln Ala		
325	330	335
Ile Glu Ala Lys Glu Gly Leu Glu Ile Gln Asn Glu Ser Met Thr Leu		
340	345	350
Ala Thr Ile Thr Phe Gln Asn Tyr Phe Arg Met Tyr Glu Lys Leu Ala		
355	360	365
Gly Met Thr Gly Thr Ala Lys Thr Glu Glu Glu Glu Phe Arg Asn Ile		
370	375	380
Tyr Asn Met Gln Val Val Thr Ile Pro Thr Asn Arg Pro Val Val Arg		
385	390	395
Asp Asp Arg Pro Asp Leu Ile Tyr Arg Thr Met Glu Gly Lys Phe Lys		
405	410	415
Ala Val Ala Glu Asp Val Ala Gln Arg Tyr Met Thr Gly Gln Pro Val		
420	425	430
Leu Val Gly Thr Val Ala Val Glu Thr Ser Glu Leu Ile Ser Lys Leu		
435	440	445
Leu Lys Asn Lys Gly Ile Pro His Gln Val Leu Asn Ala Lys Asn His		
450	455	460
Glu Arg Glu Ala Gln Ile Ile Glu Glu Ala Gly Gln Lys Gly Ala Val		
465	470	475
Thr Ile Ala Thr Asn Met Ala Gly Arg Gly Thr Asp Ile Lys Leu Gly		
485	490	495
Glu Gly Val Lys Glu Leu Gly Gly Leu Ala Val Val Gly Thr Glu Arg		

500	505	510
His Glu Ser Arg Arg Ile Asp Asn Gln Leu Arg Gly Arg Ser Gly Arg		
515	520	525
Gln Gly Asp Pro Gly Ile Thr Gln Phe Tyr Leu Ser Met Glu Asp Glu		
530	535	540
Leu Met Arg Arg Phe Gly Ala Glu Arg Thr Met Ala Met Leu Asp Arg		
545	550	555 560
Phe Gly Met Asp Asp Ser Thr Pro Ile Gln Ser Lys Met Val Ser Arg		
565	570	575
Ala Val Glu Ser Ser Gln Lys Arg Val Glu Gly Asn Asn Phe Asp Ser		
580	585	590
Arg Lys Gln Leu Leu Gln Tyr Asp Asp Val Leu Arg Gln Gln Arg Glu		
595	600	605
Val Ile Tyr Lys Gln Arg Phe Glu Val Ile Asp Ser Glu Asn Leu Arg		
610	615	620
Glu Ile Val Glu Asn Met Ile Lys Ser Ser Leu Glu Arg Ala Ile Ala		
625	630	635 640
Ala Tyr Thr Pro Arg Glu Glu Leu Pro Glu Glu Trp Lys Leu Asp Gly		
645	650	655
Leu Val Asp Leu Ile Asn Thr Thr Tyr Leu Asp Glu Gly Ala Leu Glu		
660	665	670
Lys Ser Asp Ile Phe Gly Lys Glu Pro Asp Glu Met Leu Glu Leu Ile		
675	680	685
Met Asp Arg Ile Ile Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Glu Glu Gln Phe Gly		
690	695	700
Lys Glu Gln Met Arg Glu Phe Glu Lys Val Ile Val Leu Arg Ala Val		
705	710	715 720
Asp Ser Lys Trp Met Asp His Ile Asp Ala Met Asp Gln Leu Arg Gln		
725	730	735
Gly Ile His Leu Arg Ala Tyr Ala Gln Thr Asn Pro Leu Arg Glu Tyr		
740	745	750
Gln Met Glu Gly Phe Ala Met Phe Glu His Met Ile Glu Ser Ile Glu		

755	760	765
Asp Glu Val Ala Lys Phe Val Met Lys Ala Glu Ile Glu Asn Asn Leu		
770	775	780
Glu Arg Glu Glu Val Val Gln Gly Gln Thr Thr Ala His Gln Pro Gln		
785	790	795 800
Glu Gly Asp Asp Asn Lys Lys Ala Lys Lys Ala Pro Val Arg Lys Val		
	805	810 815
Val Asp Ile Gly Arg Asn Ala Pro Cys His Cys Gly Ser Gly Lys Lys		
	820	825 830
Tyr Lys Asn Cys Cys Gly Arg Thr Glu		
835	840	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2004/001107

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/31 C12N1/21 C07K14/31 C07K14/32 C12Q1/68

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K C12Q

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

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

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	MATSUMOTO GEN ET AL: "Genetic dissection of SecA: Suppressor mutations against the secY205 translocase defect" GENES TO CELLS, vol. 5, no. 12, December 2000 (2000-12), pages 991-999, XP002302227 ISSN: 1356-9597 cited in the application the whole document ----- -/--	1-29, 31-34

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents

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

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

Date of the actual completion of the international search

22 October 2004

Date of mailing of the international search report

17/11/2004

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Schneider, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2004/001107

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	BAUD CATHERINE ET AL: "Allosteric communication between signal peptides and the SecA protein DEAD motor ATPase domain" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 16, 19 April 2002 (2002-04-19), pages 13724-13731, XP002302228 ISSN: 0021-9258 abstract page 13730 -----	1-29, 31-34
X	EP 0 892 064 A (SMITHKLINE BEECHAM PLC ; SMITHKLINE BEECHAM CORP (US)) 20 January 1999 (1999-01-20) cited in the application page 13 - page 14 -----	30
A	KLEIN M ET AL: "Functional characterization of S. carnosus SecA protein in E. coli and B. subtilis secA mutant strains" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, AMSTERDAM, NL, vol. 131, 1995, pages 271-277, XP002089426 ISSN: 0378-1097 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/DE2004/001107

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0892064	A	20-01-1999	US 6204019 B1 20-03-2001
			CA 2233590 A1 04-12-1998
			EP 0892064 A2 20-01-1999
			JP 11103871 A 20-04-1999
			US 6348342 B1 19-02-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/001107

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/31 C12N1/21 C07K14/31 C07K14/32 C12Q1/68

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K C12Q

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

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

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MATSUMOTO GEN ET AL: "Genetic dissection of SecA: Suppressor mutations against the secY205 translocase defect" GENES TO CELLS, Bd. 5, Nr. 12, Dezember 2000 (2000-12), Seiten 991-999, XP002302227 ISSN: 1356-9597 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----- -/--	1-29, 31-34

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

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

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

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

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

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

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

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

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher 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 nahelegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Oktober 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

17/11/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde,
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

Bevollmächtigter Bediensteter

Schneider, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2004/001107

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BAUD CATHERINE ET AL: "Allosteric communication between signal peptides and the SecA protein DEAD motor ATPase domain" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 277, Nr. 16, 19. April 2002 (2002-04-19), Seiten 13724-13731, XP002302228 ISSN: 0021-9258 Zusammenfassung Seite 13730 -----	1-29, 31-34
X	EP 0 892 064 A (SMITHKLINE BEECHAM PLC ; SMITHKLINE BEECHAM CORP (US)) 20. Januar 1999 (1999-01-20) in der Anmeldung erwähnt Seite 13 - Seite 14 -----	30
A	KLEIN M ET AL: "Functional characterization of S. carnosus SecA protein in E. coli and B. subtilis secA mutant strains" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 131, 1995, Seiten 271-277, XP002089426 ISSN: 0378-1097 das ganze Dokument -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/001107

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0892064	A	20-01-1999	US	6204019 B1	20-03-2001
			CA	2233590 A1	04-12-1998
			EP	0892064 A2	20-01-1999
			JP	11103871 A	20-04-1999
			US	6348342 B1	19-02-2002
