(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 09 169 A1** 2004.09.16

(12) # Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **103 09 169.6**
(22) Anmeldetag: **28.02.2003**
(43) Offenlegungstag: **16.09.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/53**
C12N 9/02

(71) Anmelder:
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, DE

(74) Vertreter:
Viering, Jentschura & Partner, 46047 Oberhausen

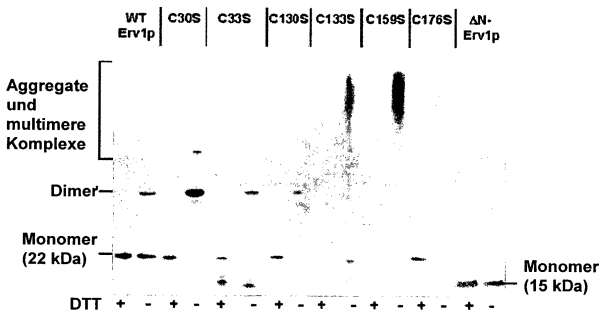
(72) Erfinder:
Hofhaus, Götz, Dr., 41468 Neuss, DE; Lisowsky, Thomas, Prof. Dr., 40789 Monheim, DE

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Rekombinante, FAD-abhängige Sulfhydryloxidasen, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft rekombinante, FAD-abhängige Sulfhydryloxidasen, in denen mindestens ein Cysteinrest derart mutiert wurde, dass dies zu einer Veränderung des Absorptionsmaximums im Vergleich zum Wildtypprotein führt, die korrespondierenden Nukleinsäuremoleküle sowie ein Verfahren zu ihrer Herstellung. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Proteine als Biokatalysatoren für die Synthese von Disulfidbrückenbindungen und deren Übertragung auf Substrate sowie als regulierbare Indikatoren für Redoxreaktionen.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft rekombinante, FAD-abhängige Sulfhydryloxidasen, in denen mindestens ein Cysteinrest derart mutiert wurde, dass dies zu einer Veränderung des Absorptionssmaximums im Vergleich zum Wildtypprotein führt, die korrespondierenden Nukleinsäuremoleküle sowie ein Verfahren zu ihrer Herstellung. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Proteine als Biokatalysatoren für die Synthese von Disulfidbrückenbindungen und deren Übertragung auf Substrate sowie als regulierbare Indikatoren für Redoxreaktionen.

[0002] Sulfhydryloxidasen sind Enzyme, welche die Einführung von Disulfidbrückenbindungen in Proteinsubstrate katalysieren (Übersicht in [1]; [2–3]). Dabei werden Thio-Verbindungen (R-SH) nach der folgenden Gleichung in die korrespondierenden Disulfid-Verbindungen umgesetzt werden:

$$2\ R\text{-}SH + O_2 \rightarrow R\text{-}S\text{-}S\text{-}R + H_2O_2.$$

[0003] Prinzipiell unterscheidet man zwischen Metalloproteinen (eisen- oder kupferhaltig) und FAD (Flavinadenindinukleotid)-abhängigen Sulfhydryloxidasen, wobei die Erfindung letztere Gruppe betrifft.

[0004] FAD-abhängige Sulfhydryloxidasen zeichnen sich gegenüber anderen Enzymen, die Dithiol/Disulfid-Transferreaktionen katalysieren, dadurch aus, dass sie Disulfidbindungen de novo synthetisieren können. Neben FAD als nicht-kovalent gebundenem Cofaktor ist den Vertretern dieser Gruppe gemein, dass sie (1) als Homodimere vorliegen, (2) Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor verwenden und (3) in ihrer Sequenz ein konserviertes CXXC-Motiv besitzen (C = Cystein, X = beliebige Aminosäure), das an der primären Redoxreaktion beteiligt ist (Übersicht in [1]; [4]). Die beiden bislang am besten untersuchten Vertreter dieser Klasse sind die Quiescin-Sulfhydryloxidasen aus Huhn und Mensch (Übersicht in [1]).

[0005] Eine eigene Untergruppe innerhalb der FAD-abhängigen Sulfhydryloxidasen stellt die Familie der Erv/Alr-Sulfhydryloxidasen dar, die nach Erv1p aus Saccharomyces cerevisiae sowie dessen humanem Homolog Alrp benannt ist (Übersicht in [1]). Diese beiden Enzyme sind auch die ersten dieser Gruppe, deren DNA- und Proteinsequenzen bekannt sind [5, 6]. Ihre Aktivität ist essentiell für das Überleben der Zellen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Biogenese von Mitochondrien, insbesondere hinsichtlich einer intakten Membranmorphologie, sowie in der Versorgung cytoplasmatischer Proteine mit Eisen/Schwefel-Clustern, die in den Mitochondrien gebildet werden (Übersicht in [1]; [7]). Im endoplasmatischen Reticulum von Saccharomyces cerevisiae wurde vor kurzem eine zweite Sulfhydryloxidase gefunden, die als Erv2p bezeichnet wurde [8, 9].

[0006] Die C-terminalen Domänen von Erv1p und Erv2p, die das redoxaktive Zentrum und die FAD-Bindedomäne enthalten, sind einander sehr ähnlich (30% Identität). Sie sind insbesondere durch ein konserviertes YP-CXXC-Motiv (Y = Tyrosin, P = Prolin, C = Cystein, X = beliebige Aminosäure) gekennzeichnet, das für die enzymatische Aktivität sowie die Interaktion mit FAD essentiell ist. Bei Erv1p entspricht dieses Motiv den Aminosäureresten 128–133.

[0007] Ein weiteres Charakteristikum dieser Enzyme ist ihre wenig konservierte N-terminale Domäne, die für die subzelluläre Lokalisation der Proteine, die Homodimerbildung sowie möglicherweise auch für die Substratinteraktion wichtig sind [10]. Erv1p weist in dieser Region ein zweites CXXC-Motiv auf (Aminosäuren 30–33), das Erv2p fehlt. Letzteres enthält allerdings an seinem C-Terminus ein möglicherweise funktionell homologes CGC-Motiv (G = Glycin). Die genauen strukturellen bzw. funktionellen Aufgaben, welche die einzelnen Cysteinreste in Erv1p bzw. Erv2p innehaben, sind bislang noch nicht völlig verstanden, werden aber derzeit intensiv untersucht.

[0008] In vielen Anwendungsbereichen, z.B. bei der Teigherstellung für Backwaren oder der Entfernung von Fremdaromen aus Milch oder Bier, ist die Oxidation freier Sulfhydrylgruppen zu Disulfiden erwünscht. Da enzymkatalysierte Reaktionen im Vergleich zum Einsatz unspezifischer Oxidationsmittel (etwa Wasserstoffperoxid, Perazide oder Bromide) keine unerwünschten Nebenprodukte bilden und die Reaktion auch wesentlich schneller abläuft, wurde die Verwendung von Sulfhydryloxidasen für zahlreiche Applikationen beschrieben.

[0009] Die Europäische Patentanmeldung EP 0 705 538 A1 offenbart eine Enzymzusammensetzung aus einer Sulfhydryloxidase und einer Hemicellulase zur Verbesserung der Teigeigenschaften von Brot und anderen Backwaren. Das US Patent 5,547,690 beschreibt eine weitere Enzymzusammensetzung, bestehend aus einer Sulfhydryloxidase und einer Glucoseoxidase, welche die rheologischen Eigenschaften, insbesondere die Stabilität, von Teigzubereitungen verbessert.

[0010] Die Deutsche Patentanmeldung DE 198 40 489 A1 beschreibt stabile Wirkstoffzubereitungen für Lebensmittel, Futtermittel oder pharmazeutische Anwendungen, bei denen der/die Wirkstoffe von einer Proteinschicht umgeben sind. Zur Herstellung dieser Zubereitungen wird das Hüllprotein enzymatisch quervernetzt, u.a. durch die Sulfhydryloxidasekatalysierte Synthese von Disulfidbrückenbindungen.

[0011] Bislang wurden Sulfhydryloxidasen hauptsächlich aus Milch bzw. aus verschiedenen Pilzen isoliert. U.S. Patent 4,087,328 beschreibt ein mehrstufiges, konventionelles Reinigungsverfahren für Sulfhydryloxidase aus Rohmilch von Kühen. Ein anderes Verfahren zur Reinigung von Sulfhydryloxidase aus dem Schimmel-

pilz Aspergillus niger ist im U.S. Patent 4,894,340 offenbart. Daneben wurde in der Europäischen Patentanmeldung EP 0 565 172 A1 auch ein rekombinantes Verfahren zur Herstellung von Sulfhydryloxidasen aus filamentösen Pilzen, vorzugsweise wiederum aus Aspergillus spec., in biotechnologischem Maßstab offenbart.

[0012] Bislang war es allerdings nicht möglich, Sulfhydryloxidasen herzustellen, deren katalytische Aktivität reguliert werden kann, obwohl eine derartige enzymatische Steuerungsmöglichkeit von Redoxreaktionen für eine Vielzahl von Anwendungen in der Grundlagenforschung, aber z.B, auch. in der Lebensmitteltechnologie wünschenswert wäre.

[0013] Aufgabe der Erfindung ist es daher, die katalytische Aktivität von Sulfhydryloxidasen steuern zu können.

[0014] Dieses Ziel wird durch die Bereitstellung neuartiger Sulfhydryloxidasen als molekularen Werkzeuge sowie die rekombinante Herstellung solcher FAD-abhängiger Sulfhydryloxidasen in ausreichend großen Mengen gemäß Anspruch 1 erreicht. Bei diesen erfindungsgmäßen Sulfhydryloxidasen wurde mindestens ein Cysteinrest der Amino-säuresequenz derart mutiert, dass das Absorptionssmaximum gegenüber dem Wildtypprotein verändert ist.

[0015] Die Erfindung beruht dabei auf der überraschenden Entdeckung, dass der Austausch bestimmter Cysteinreste in der Aminosäuresequenz einer Sulfhydryloxidase aus Saccharomyces cerevisiae nicht nur die Enzymaktivität und die Homodimerbildung beeinflusste, sondern auch eine Farbveränderung des Proteins zur Folge hatte. FAD-abhängige Sulfhydryloxidasen erscheinen aufgrund des gebundenen FAD-Cofaktors gelb. Infolge des Austausches eines einzelnen Cysteinrests ist jedoch eine Farbänderung zu beobachten und so wurde u.a. ein schwarzes Protein erhalten, das weiterhin katalytisch aktiv war.

[0016] Ferner wurde festgestellt, dass die Farbgebung reversibel durch Einstellung des Redoxpotentials gesteuert werden kann. Da sich so Redoxreaktionen sehr leicht anhand der Farbänderung verfolgen lassen, sind die Enzyme der Erfindung ideale Werkzeuge zur gezielten Steuerung von Redoxreaktionen.

[0017] Die Erfindung schließt alle modifizierten Sulfhydryloxidasen ein, bei denen das Absorptionsmaximum gegenüber dem Wildtypprotein verändert ist. Das Absorptionsmaximum bezeichnet die Wellenlänge ("Farbe") des Lichtes, bei der eine Substanz beim Durchleuchten die Intensität am stärksten reduziert. Licht anderer Wellenlängen wird besser durchgelassen. Im sichtbaren Licht erscheint dadurch die Substanz in der Komplementärfarbe zu ihrem Absorptionsmaximum. Eine Veränderung des Absorptionsmaximums gemäß der Erfindung umfasst dabei alle Veränderungen des Absorptionsverhaltens, die eine Farbänderung des Sulfhydryloxidase-Proteins zur Folge haben.

[0018] Die Sulfhydryloxidasen gemäß der Erfindung können mit Hilfe rekombinanten DNA-Technologie hergestellt werden, die eine vollständige Kontrolle der Sequenz und damit auch der Eigenschaften eines bestimmten Enzyms erlaubt. Mutationen können sehr einfach unter Verwendung etablierter Standardverfahren [20] in die Aminosäuresequenz eingeführt werden.

[0019] Die Erfindung schließt alle rekombinanten Sulfhydryloxidasen ein, in denen ein oder mehrere Cysteinreste ersetzt wurden, wobei Cystein prinzipiell gegen eine beliebige Aminosäure ausgetauscht werden kann. In bevorzugten Ausführungsformen wird der Cysteinrest durch einen Serinrest ersetzt. Bislang konnte jedoch seitens der Erfinder noch nicht abschließend geklärt werden, ob die spezifische Einführung eines Serinrests in die Aminosäuresequenz in direktem Zusammenhang mit den beobachteten Farbänderungen der mutierten Proteine steht. Es sollte entsprechend dem Verständnis der Erfinder deshalb möglich sein, auch durch Substitution eines oder mehrerer Cysteinreste durch andere Aminosäuren Farbänderungen der mutierten Proteine hervorzurufen, so z.B. durch den Austausch von Cystein gegen Alanin oder Threonin, die beide zu Serin ähnliche Eigenschaften besitzen. Daneben könnte dies aber durchaus auch durch die Einführung z.B. eines Arginin- oder eines Leucinrests anstelle eines Cysteinrests bewirkt werden.

[0020] Grundsätzlich können alle in einer bestimmten Sulfhydryloxidase vorkommenden Cysteinreste gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht werden. In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung werden jedoch ein oder mehrere Cysteinreste ersetzt, die redoxreaktiv sind. Unter "redoxreaktiven" Cysteinresten versteht man erfindungsgemäß dabei diejenigen Reste, die im Verlauf der katalytischen Reaktion einen Zyklus aus Oxidation und Reduktion durchlaufen und dabei eine Disulfidbrücke ausbilden. Beispiele für redoxreaktive Cysteinreste sind etwa C130 und C133 in Erv1p aus Saccharomyces cerevisiae.

[0021] Die Erfindung schließt ferner Sulfhydryloxidasen ein, die sich von der als "Wildtyp" anerkannten Sequenz aufgrund von alternativem Splicing einer gemeinsamen prä-mRNA unterscheiden, aber nach wie vor katalytisch aktiv sind.

[0022] Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung umfassen rekombinante Sulfhydryloxidasen aus der Familie der Evr/Alr-Sulfhydryloxidasen, wobei wiederum Erv1p aus Saccharomyces cerevisiae (SEQ ID. Nr. 1) bevorzugt wird.

[0023] Bevorzugt sind ferner Sulfhydryloxidasen, die von Erv1p aus Saccharomyces cerevisiae abgeleitet sind, und bei denen mindestens ein redoxaktiver Cysteinrest ersetzt wurde, insbesondere die Enzyme mit einer Cystein → Serin-Mutation an Position 30 (C30S; SEQ ID Nr. 2) bzw. einer Cystein → Serin-Mutation an Position 130 (C130S; SEQ ID Nr. 3).

[0024] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung umfasst rekombinante Erv1-Sulfhydryloxidasen aus Arabidopsis thaliana (SEQ ID Nr. 4).

[0025] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält die rekombinante Sulfhydryloxidase ein Protein- oder Peptidaffinitätsepitop an ihrem N-Terminus und/oder C-Terminus, das eine einfache Detektion und/oder Reinigung des Proteins er-möglicht. Geeignete Epitope sind zum Beispiel das myc-Epitop, das FLAG-Epitop, das His_6-Epitop oder das HA-Epitop.

[0026] Ferner betrifft die Erfindung Nukleinsäuremoleküle (DNA und RNA), die Nukleinsäuresequenzen umfassen, welche die hier offenbarten Sulfhydryloxidasen kodieren. Da es aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes möglich ist, bestimmte Codons durch andere Codons zu ersetzen, welche die gleiche Aminosäure kodieren, ist die Erfindung nicht auf ein spezifisches Nukleinsäuremolekül beschränkt, das eine Sulfhydryloxidase gemäß der Erfindung kodiert, sondern schließt alle Nukleinsäuremoleküle ein, die eine funktionelle Sulfhydryloxidase kodieren.

[0027] Die Erfindung schließt ferner Nukleinsäuremoleküle ein, die sich aufgrund von alternativem Splicing eines gemeinsamen prä-mRNA Moleküls von der als "Wildtyp" anerkannten Sequenz unterscheiden. Derartige Splicing-Mechanismen umfassen die alternative Verwendung von Exons (i.e. Nukleinsäuresequenzen, die eine Aminosäuresequenz kodieren), die alternative Anordnung von Exons sowie das "Nicht-entfernen" von Introns (i.e, intervenierende Sequenzen, die normalerweise keine Aminosäuresequenz kodieren) aus dem mRNA-Molekül.

[0028] In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung kodieren die Nukleinsäuremoleküle rekombinante Sulfhydryloxidasen aus der Familie der Evr/Alr-Sulfhydryloxidasen, wobei insbesondere Erv1p aus Saccharomyces cerevisiae (SEQ ID. Nr. 1) bevorzugt wird.

[0029] Andere bevorzugte Ausführungsformen umfassen Nukleinsäuresequenzen für Sulfhydryloxidasen, in denen ein redoxaktiver Cysteinrest ersetzt wurde. Besonders bevorzugt werden Nukleinsäuresequenzen, die von Erv1p aus Sacharomyces cerevisiae abgeleitet sind, und hier insbesondere die Nukleinsäuresequenzen, die für eine Cystein → Serin-Mutation an Position 30 (C30S; SEQ ID Nr. 2) bzw. eine Cystein → Serin-Mutation an Position 130 (C130S; SEQ ID Nr. 3) kodieren.

[0030] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform umfasst Nukleinsäuremoleküle, welche die Erv1-Sulfhydryloxidase aus Arabidopsis thaliana (SEQ ID Nr. 4) kodieren.

[0031] Ein hier offenbartes Nukleinsäuremolekül kann "operativ" mit einer regulatorischen Sequenz verknüpft sein, um die Expression des Nukleinsäuremoleküls zu ermöglichen.

[0032] Ein Nukleinsäuremolekül wird als "fähig zur Expression einer Nukleinsäuresequenz" bezeichnet, wenn es Sequenzelemente umfasst, die Informationen hinsichtlich der Regulation von Transkription und/oder Translation enthalten, und diese Elemente "operativ" mit der das Polypeptid kodierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sind. Eine operative Verknüpfung ist eine Verknüpfung, bei der die regulatorischen Sequenzelemente und die proteinkodierende Sequenz derart verbunden sind, dass Genexpression möglich ist. Die genaue Beschaffenheit der zur Genexpression erforderlichen regulatorischen Bereiche kann zwischen verschiedenen Spezies variieren. In der Regel umfassen diese Bereiche jedoch einen Promotor, der in Prokaryonten aus dem Promotor per se besteht, i.e. DNA-Elemente, welche die Transkriptionsinitiation steuern, sowie aus DNA-Elementen, die nach ihrer Transkription in mRNA den Beginn der Translation regulieren. Solche Promotoren schließen normalerweise 5' nicht-kodierende Sequenzen ein, die an der Initiation von Transkription und Translation beteiligt sind, wie zum Beispiel die –35/–10-Elemente und das Shine-Dalgarno Element in Prokaryonten oder die TATA-Box, CAAT-Sequenzen und 5'-Capping-Elemente in Eukaryonten. Diese Regionen können ferner auch Enhancer- oder Repressorelemente enthalten sowie translatierte Signalsequenzen, um die native Polypeptidkette in ein spezielles Kompartiment der Wirtszelle zu dirigieren Zusätzlich können auch die 3' nicht-kodierenden Regionen regulatorische Elemente enthalten, die an der Termination der Transkription, der Polyadenylierung o.ä. beteiligt sind. Falls diese Terminationssequenzen in einer speziellen Wirtszelle nicht oder nur unzureichend funktionell sind, können sie durch Signale ersetzt werden, die in der betreffenden Zelle ausreichend funktionell sind.

[0033] Ein Nukleinsäuremolekül gemäß der Erfindung kann demnach eine regulatorische Sequenz, insbesondere eine Promotorsequenz umfassen. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfasst das Nukleinsäuremolekül gemäß der Erfindung eine Promotorsequenz sowie eine Transkriptionsterminationssequenz. Geeignete prokaryontische Promotoren sind zum Beispiel der lacUV5-Promotor oder der T7-Promotor. Beispiele für geeignete eukaryontische Promotoren sind der SV40-Promotor oder der CMV-Promotor.

[0034] Die Nukleinsäuremoleküle gemäß der Erfindung können ferner in einem Vektor oder einem anderen Klonierungsvehikel enthalten sein, wie zum Beispiel Phagen, Phagemiden, Cosmiden, Baculoviren oder künstlichen Chromosomen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Nukleinsäuremolekül in einem Vektor enthalten, insbesondere in einem Expressionsvektor. Ein derartiger Expressionsvektor kann neben den oben bereits beschriebenen regulatorischen Sequenzen und der Nukleinsäuresequenz, die eine Sulfhydryloxidase gemäß der Erfindung kodiert, Replikations- und Kontrollsequenzen umfassen, die von einem Organismus stammen, der mit dem zur Expression verwendeten Wirt kompatibel ist, sowie weiterhin mindestens einen Selekti-

onsmarker, der einen selektierbaren Phänotyp auf eine transformierte Zelle überträgt. Eine große Zahl geeigneter Vektoren, z.B. pBluescript, pUC18, pET oder pcDNA3, ist detailliert beschrieben und kommerziell erhältlich.

[0035] DNA-Moleküle, die eine Sulfhydryloxidase gemäß der Erfindung kodieren, und insbesondere ein Vektor, der die kodierende Sequenz einer solchen Sulfhydryloxidase enthält, können in eine entsprechende Wirtszelle transformiert werden, die zur Expression dieser DNA-Moleküle geeignet ist. Die Transformation kann dabei mit Hilfe etablierter Standardverfahren [20] durchgeführt werden. Die Erfindung betrifft daher auch eine Wirtszelle, die ein hier offenbartes Nukleinsäuremolekül enthält.

[0036] Die transformierten Wirtszellen werden in der Folge unter Bedingungen kultiviert, die zur Expression der Nukleotidsequenzen, die eine Sulfhydryloxidase gemäß der Erfindung kodieren, geeignet sind. Die verwendeten Wirtszellen können prokaryontischen Ursprungs sein, wie z.B. Escherichia coli (E. coli) oder Bacillus subtilis, oder eukaryontischen Ursprungs, wie etwa Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, SF9 oder High5 Insektenzellen, immortalisierte Säugetierzelllinien (z.B. HeLa-Zellen oder CHO-Zellen) oder primäre Säugetierzellen.

[0037] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung einer Sulfhydryloxidase gemäß der Erfindung. Dieses Verfahren umfasst die folgenden Schritte:

(a) Klonieren eines Nukleinsäuremoleküls, das eine Sulfhydryloxidase kodiert, in einen geeigneten Vektor, und

(b) Einbringen des in (a) erhaltenen rekombinanten Vektors in eine geeignete Wirtszelle oder einen geeigneten Zellextrakt.

[0038] Schritt (a) kann dabei mit einem Nukleinsäuremolekül durchgeführt werden, das nur die Sulfhydryloxidase kodiert. Alternativ kann er aber auch mit einem Nukleinsäuremolekül durchgeführt werden, in dem die Sulfhydryloxidase operativ mit einer regulatorischen Sequenz verknüpft ist. Optional kann das Nukleinsäuremolekül gemäß der Erfindung auch mit einem Fusionspartner verknüpft sein, wie etwa einem Affinitätsepitop, das eine einfache Reinigung und/oder Detektion des rekombinanten Proteins erlaubt. Die Expression der so klonierten Nukleinsäuremoleküle kann in einer rekombinanten Zelle oder einem Zellextrakt erfolgen, die/der alle für die Transkription und Translation erforderlichen Faktoren enthält.

[0039] Die Erfindung betrifft weiterhin eine Zusammensetzung, die mindestens eine rekombinante Sulfhydryloxidase gemäß der Erfindung enthält. Die Zusammensetzung kann dabei ausschließlich Sulfhydryloxidasen umfassen, aber auch weitere enzymatisch aktive Proteine enthalten, wie z.B. Lipoxygenasen, Proteindisulfidisomerasen, Lysyloxidasen, Tyrosinoxidasen, Hemicellulasen oder Glucoseoxidasen. Ferner kann die Zusammensetzung je nach Verwendungszweck auch Trägerstoffe (z.B. Stärke, Laktose, Gelatine, Fette, Wachse, Öle oder Polyole), verschiedenen Zusatzstoffe (etwa Füllstoffe, Stabilisierungsmittel, Emulgiermittel oder Konservierungsmittel, Puffersubstanzen, Lösungsmittel oder Lösungsvermittler) oder Transportvehikel umfassen. Die Zusammensetzung kann in fester Form vorliegen, z.B. lyophilisiert oder kristallin, oder aber gelöst, z.B. als Suspension oder Emulsion.

[0040] Außerdem wird die Verwendung der rekombinanten Sulfhydryloxidasen als Biokatalysatoren für die Synthese von Disulfidbrückenbindungen sowie deren Übertragung auf Substrate offenbart, z.B. auf Dithiothreitol, Cystein oder Homocystein. Im Vergleich zu herkömmlichen Sulfhydryloxidasen besitzen die gentechnologisch modifizierten Enzymen der Erfindung den entscheidenden Vorteil, dass sie regulierbar sind, und diese Regulation anhand von Farbänderungen des Proteins leicht verfolgt werden kann. Die Steuerung der Farbgebung des Proteins erfolgt dabei reversibel durch Einstellung des Redoxpotentials über Dithiothreitol, β-Mercaptoethanol bzw. über Luftsauerstoff. Dadurch wird es möglich, eine Disulfidbindung gezielt auf ein bestimmtes Substratmolekül zu übertragen und die Reaktion anhand der Farbänderung des Proteins zu verfolgen.

[0041] Die Besonderheit der Erv1/Alr Sulfhydryloxidasen ist ihre Substratspezifität für Dithiole mit einem definierten Abstand, da sie so in der zellulären Umgebung unabhängig vom Glutathionspiegel gezielte Disulfidbrücken einfügen können. Jüngste Untersuchungen der Erfinder zeigen folgende Reihenfolge von künstlichen in vitro Substraten: Thioredoxin (reduziertes CXXC) > Dithiothreitol > Di-Mercaptoethanol Lysozym (reduziert) > Cystein. Demzufolge scheinen Erv/Alr Sulfhydryloxidasen eine starke Präferenz für Dithiole in Proteinen mit einem genau definierten Abstand zu haben. Thioredoxin der Haupt-Redoxregulator der Zelle bei den aufgeführten Phänomenen. Dabei wirkt Erv/Alrp als Thioredoxin-Oxidase und kann so in die Regulation eingreifen.

[0042] Die Enzyme der Erfindung können z.B. klinisch bei der Entwicklung diagnostischer Reagenzien und Testsysteme von Bedeutung sein. Reduziertes Thioredoxin ist z.B. ein essentieller Cofaktor der intrazellulären Signalübertragung, der Steuerung von Apoptose und Nekrosenbildung sowie der Modulation der Fragilität roter Blutkörperchen. Auch als Antioxidationsmittel ist es von großer Bedeutung. Die dabei stattfindende Oxidation schützt u.a. das vaskuläre Endothel vor einer Schädigung durch freie Radikale. Die gezielte Steuerung bzw. der Nachweis einer erfolgten Disulfidbrückenbildung können daher für die Diagnose, aber auch Therapie einer Reihe von Krankheiten vorteilhaft sein Die rekombinanten Sulfhydryloxidasen der Erfindung können ferner als regulierbare Sensoren/Indikatoren für Redoxreaktionen verwendet werden. SO kann z. B. die Sauer-

stoffkonzentration des Mediums über das Redoxpotential die Farbe des Proteins beeinflussen.

[0043] Umgekehrt kann aber auch die Farbe des Proteins durch Änderung des Redoxpotentials variiert werden. Die Enzyme gemäß der Erfindung können demnach auch als redox-regulierte Pigmente verwendet werden. Ein Protein der Erfindung kann z.B. zwischen zwei Glasscheiben eingebracht werden, welche mit Elektroden verbunden sind. Durch elektrische Steuerung des Redoxpotentials kann das Protein die Glasfläche einfärben und somit als Lichtschutz fungieren.

[0044] Da die hier offenbarten Enzyme nach den bislang vorliegenden Ergebnissen für Zellen nicht toxisch zu sein scheinen, sollten sie auch in vivo als Lichtschutzfaktor einsetzbar sein, da sich die Lichtdurchlässigkeit von Zellen wiederum über das Redoxpotential regulieren lässt.

[0045] Die rekombinanten Enzyme der Erfindung, und insbesondere die C30S-Variante von Erv1p aus Saccharomyces cerevisiae (SEQ ID Nr. 2) können weiterhin als Akzeptormoleküle in Resonanzenergietransfer (RET)-Applikationen zur Bestimmung von Abständen zwischen Makromolekülen eingesetzt werden. Beispiele derartiger Verfahren sind Fluoreszenz-RET (FRET) und Biolumineszenz-RET (BRET) [17, 18]. Das Prinzip beruht dabei auf dem strahlungslosen Transfer von Lichtenergie von einem direkt angeregten Donormolekül auf ein sich in der Nähe befindliches Akzeptormoleül. Damit ein Energietransfer stattfinden kann, müssen die Emmissions- bzw. Absorptionsspektren von Donor bzw. Akzeptor überlappen. Aufgrund seiner schwarzen Farbe und des breiten Absorptionsspektrums kann die Q30S-Variante von Erv1p als universelle Akzeptordomäne eingesetzt werden, die sich mit einem beliebigen Donormolekül kombinieren lässt.

[0046] Die Erfindung wird ferner durch die folgenden nicht-einschränkenden Figuren und Beispiele veranschaulicht.

[0047] Dabei zeigt **Fig.** 1 die Expression von Wildtyp (WT)-Erv1p sowie verschiedener mutierter Varianten (C = Cystein, S = Serin). Die gereinigten Proteine (vgl. auch Beispiel 1) tragen an ihrem C-Terminus jeweils ein His_6-Affinitätsepitop, das sowohl eine schnelle Reinigung als auch den immunchemischen Nachweis erlaubt. Pro Spur wurden 200 ng gereinigtes Protein mit (+) bzw. ohne (–) 20 mM DTT im Probenpuffer auf 4%–12% nicht-reduzierende SDS-Polyacrylamiggele (Novex/Invitrogen) aufgetragen. Die Proteine wurden über einen primären anti-His_5 Antikörper und einen AP-gekoppelten sekundären Antikörper chemiluminometrisch nachgewiesen.

[0048] **Fig.** 2 zeigt die Bestimmung der in vitro-Aktivität von Wildtyp (WT)-Erv1p sowie verschiedener mutierter Varianten. Die Enzymaktivität der gereinigten Proteine (vgl. auch Beispiel 2) wurde photometrisch mit DTT (entsprechend 50 nmol reduzierte Thiol-Gruppen) als Substrat gemessen. Der Substratumsatz wurde dabei pro proteingebundenes FAD-Molekül (gemäß der spektroskopischen Bestimmung) angegeben. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

[0049] **Fig.** 3 zeigt die unterschiedlichen Färbungen von gereinigtem Wildtyp (WT)-Erv1p sowie verschiedener mutierter Varianten. Aufgrund von unterschiedlicher Expression in E. coli variieren die Proteinkonzentrationen der einzelnen Lösungen. Erv1p (5.9 mg/ml), C30S (36 mg/ml), C33S (10.8 mg/ml), C130S (14.1 mg/ml), C133S (4.1 mg/ml), C159S (9.9 mg/ml), C176S (6.0 mg/ml) und ΔN-Erv1p (4.1 mg/ml).

[0050] **Fig.** 4 zeigt Spektren für Wildtyp (WT)-Erv1p sowie die beiden Cystein → Serin Varianten C30S und C130S. Die gereinigten Proteine wurden in einem Zeiss S10 Dioden-Array Photometer in einem Wellenlängebereich von 320 nm bis 700 nm analysiert (vgl. auch Beispiel 3). Die verwendeten Proteinlösungen hatten die folgenden Konzentrationen: 2.2 mg/ml (Erv1p), 5.1 mg/ml (C30S) und 4.2 mg/ml (C130S). Da der FAD-Gehalt der Proben unterschiedlich ist, und auch die molaren Absorptionskoeffizienten für die mutierten Proteine variieren können, werden die Spektren nur qualitativ bewertet.

Beispiel 1

Klonierung und Reinigung von rekombinanten Erv1p-Varianten aus Saccharomyces cerevisiae

[0051] Die cDNAs für das vollständige ERV1-Gen sowie eine 5'-terminal verkürzte Variante (ΔN-Erv1p; entspricht Aminosäure 73–189 des Wildtyps) wurden mittels etablierter Standardverfahren [20] amplifiziert und als NdeI/XhoI-Fragmente in den Vektor pET24a(+) (Novagen) kloniert [5]. Der rekombinante Vektor, der die vollständige cDNA-Sequenz kodierte, wurde im folgenden zur oligonukleotid-gerichteten Mutagenese ("Excite" PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit/Stratagene) verwendet. Die zur Einführung der einzelnen Mutationen (C = Cystein, S = Serin) verwendeten Primer (jeweils vorwärts/rückwärts) haben die folgenden Sequenzen:

C30S (5'-CGATCA TGTAACACCCTAC-3'/5'-CGAAGGTTTGCCATCTTCG-3'),

C33S (5'-CTACTTGACTTT CAGTACGTGACC-3'/5'-GGTGGTAGATGATCGGCAAGGTTTGC-3'),

C130S (5'-CCA ATTGGTGTGCTAAAGACTTTG-3'/5'-AAGGATAAATATGTGAGAAGATATTC-3'),

C133 (5'-CTTTGAAAAAT ATATCAGAGAAAATG-3'/5'-TCTTTAGCAGACCAGTTGTAAGG-3'),

C159S (5'-GCCCACAATAAAGTCAATAAGAAAT-3'/5'-CTCAGACATCCACCTCCCAAG TTCTT-3')

C176S (5'-CTCCAATTTCTGGGAAAAAAGATGGAAG-3'/5'-TCAAATTTG GGCTTCCTCAATTTC-3').

[0052] Die Identität der mutierten Sequenzen wurde anhand von Restriktions- bzw. Sequenzanalysen verifiziert.

[0053] Die gereinigten Plasmide (Plasmid Purification Kit/QIAGEN) wurden in E. coli BL21(+) (Novagen) transformiert und amplifiziert [20]. Die Reinigung der einzelnen Proteine erfolgte über ein His_6-Affinitätsepitop (in der Sequenz von pET24a(+) kodiert) an deren C-Termini. Die Reinigung wurde mit Hilfe von Ni^{2+} NTA-Agarose unter nativen Bedingungen in Phosphatpuffer (50mM NaCl, 50mM KH_2PO_4, 10mM Imidazol, pH 7.5) nach Herstelleranweisung (QIAGEN) durchgeführt. Die Homogenität der Proteinpräparationen wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Analyse verifiziert. Dazu wurden jeweils 200 ng Protein in 4%–12% nicht-reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelen (Novex/Invitrogen) aufgetrennt. Die Bildung von Protein-Dimeren (oder -Multimeren) wurde durch Zugabe bzw. Weglassen von DTT (20mM) im Probenpuffer untersucht (siehe **Fig.** 1).

[0054] Aus **Fig.** 1 ist ersichtlich, dass die N-terminal verkürzte Erv1p ausschließlich als Monomer, das Wildtypprotein jedoch als eine Mischung aus Monomeren und Dimeren vorliegt. Dies zeigt, dass die N-terminale Domäne für die Bildung von Dimeren entscheidend ist. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen findet man mit Ausnahme von C133S keine Monomere. Die mutierten Proteine C30S, C33S und in geringerem Maße C130S liegen vornehmlich als Dimere vor, d.h. zumindest die beiden Cysteinreste an Position 30 bzw. 33 sind an der Dimerbildung beteiligt. Das Vorliegen hochmolekularer Proteinmultimere bei den Varianten C133S, C159S und C176S deutet hingegen eine unspezifische Aggregation dieser Proteine an.

Beispiel 2

Analyse der in vitro-Enzymaktivität von Erv1p-Varianten

[0055] Zur Aktivitätsbestimmung wurden die Konzentrationen der einzelnen Proteine auf 10 pmol proteingebundenes FAD pro 100 µl Reaktionsansatz eingestellt.

[0056] Die Enzymreaktion wurde in PBS (68mM NaCl, 75mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.5, der 3mM EDTA enthält) mit DTT als Substrat (entsprechend 50 nmol reduzierter Thiolgruppen) durchgeführt. Für jede Messung wurde ein 100 µl Aliquot dieser Reaktionsmischung entnommen. Zur Bestimmung des Thiolgehalts wurden die Aliquots mit 800 µl PBS und 100 µl DTNB-Lösung (5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure, Ellman's Reagens; Endkonzentration 10mM) versetzt. Nach 2 min Inkubation wurde die Extinktion bei 412 nm gemessen und der Thiolgehalt berechnet (molarer Extinktionskoeffizient $14mM^{-1}\ cm^{-1}$ [21]). Der Thiolgehalt in der Ausgangsmischung wurde in einer Probe ohne Enzymzugabe ermittelt. Der Substratumsatz wurde pro proteingebundenes FAD-Molekül angegeben. Die in **Fig.** 2 dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

[0057] Die mutierten Proteine zeigen unter in vitro Bedingungen keine (C130S, C133S) oder nur eine stark verminderte (C30S, C33S, C159S, C176S) Enzymaktivität, sodass alle sechs getesteten Cysteinreste für die volle Aktivität der Erv1p-Sulfhydryloxidase wichtig zu sein scheinen. Die Aktivität der N-terminal verkürzten Erv1p ist erstaunlicherweise mit der des Wildtypproteins vergleichbar. Eine weitere Studie [19] hat jedoch gezeigt, dass das verkürzte Protein den Wildtyp in vivo nicht ersetzen kann.

Beispiel 3

Spektroskopische Analyse von Erv1p-Varianten

[0058] Der Austausch von Cystein- gegen Serinreste hatte in einigen Fällen auch eine Veränderung der Proteinfärbung zur Folge (siehe **Fig.** 3). Während das Wildtypprotein und die N-terminal verkürzte Erv1p aufgrund des gebundenen FAD intensiv gelb erscheinen, führt eine Mutation an Position 30 zu einer Schwarzfärbung des Proteins, eine Mutation an Position 130 hingegen zu einer Orangefärbung. Erv1p(C159S) erscheint farblos, und die anderen drei Varianten (C33S, C133C und C176S) sind ähnlich dem Wildtyp gelb gefärbt.

[0059] Alle Farben verschwinden nach Reduktion der Proteine mit Dithionit. Nach Reoxidation in der Luft verfärben sich die Proteinlösungen gelb. Auch bei längerer Lagerung (über mehrere Tage) verändern sich die Farben der mutierten Proteine hin zum Gelb des Wildtyps, vermutlich ebenfalls durch Oxidation mit Luftsauerstoff. Im Stand der Technik gelang es nach einer derartigen Verfärbung nicht, die ursprüngliche Farbe eines mutierten Proteins wiederherzustellen.

[0060] Die Farbveränderungen der beiden Erv1p-Varianten C30S und C130S wurden in einem Zeiss S10 Dioden-Array Photometer im Detail untersucht. Es wurden Spektren in einem Wellenlängebereich von 320 nm bis 700 nm aufgenommen (vgl. **Fig.** 4). Die verwendeten Proteinlösungen hatten die folgenden Konzentrationen: 2.2 mq/ml (WT-Erv1p), 5.1 mg/ml (C30S) und 4.2 mg/ml (C130S). Da der FAD-Gehalt der Proben unterschiedlich ist, und auch die molaren Absorptionskoeffizienten für die mutierten Proteine variieren können, werden die Spektren nur qualitativ bewertet. Auffällig sind bei der C30S-Variante ein zusätzliches Absorptionsmaximum bei 580 nm sowie eine Verbreiterung der Absorption bei 460 nm (entspricht FAD) bei der C130S-Variante. Die Spektren aller anderen mutierten Proteine entsprechen dem Wildtypprotein (nicht gezeigt).

Referenzen:

[1] Thorpe, C. et al. (2002) Arch. Biochem. Biophys. 405, 1-12.
[2] Lash, L.H. and Jones, D.P. (1983) Arch. Biochem. Biophys. 225, 344–352.
[3] Hoober, K.L. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 22147-22150.
[4] Hoober, K.L. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 31759-31762.
[5] Lee, J.E. et al. (2000) FEBS Lett. 477, 62–66.
[6] Giorda, R. (1996) Mol. Med. 2, 97–108.
[7] Lange, H. et al. (2001) EMBO Rep. 2, 715–720.
[8] Sevier, C.S. et al. (2001) Nat. Cell Biol. 3, 874–882.
[9] Gerber, J. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276, 23486-23491.
[10] Hofhaus, G. and Lisowsky, T. (2002) Methods Enzymol. 348, 314–324.
[11] Europäisches Patentanmeldung EP 0 705 538 A1
[12] U.S. Patent 5,547,690
[13] Deutsches Patentanmeldung DE 198 40 489 A1
[14] U.S. Patent 4,087,328
[15] U.S. Patent 4,894,340
[16] Europäisches Patent EP 0 565 172 A1
[17] Boute, N. et al. (2002) Trends Pharmacol. Sci. 23, 351-354.
[18] Heyduk, T. (2002) Curr. Opin. Biotechnol. 13, 292–296.
[19] Lisowsky, T. (1996) Yeast 12, 1501–1510.
[20] Sambrook, J. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
[21] Riddles, P.W. et al. (1979) Anal. Biochem. 94, 75–81.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
<120> Rekombinante, FAD-abhängige Sulfhydryloxidasen und ihre Anwendung
<160> 4

<210> 1
<211> 567
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>
<221> CDS
<222> (1) ... (567)
<223> kodierende Sequenz der Sulfhydryloxidase Erv1p

<400> 1

```
atg aaa gca ata gat aaa atg acg gat aat cca cca caa gaa ggc tta        48
Met Lys Ala Ile Asp Lys Met Thr Asp Asn Pro Pro Gln Glu Gly Leu
  1               5                  10                  15

agt ggg agg aaa ata ata tat gac gaa gat ggc aaa cct tgc cga tca        96
Ser Gly Arg Lys Ile Ile Tyr Asp Glu Asp Gly Lys Pro Cys Arg Ser
             20                  25                  30

tgt aac acc cta ctt gac ttt cag tac gtg acc ggg aag ata tct aat       144
Cys Asn Thr Leu Leu Asp Phe Gln Tyr Val Thr Gly Lys Ile Ser Asn
         35                  40                  45

ggc ctg aag aac ctc tca tct aac ggt aaa cta gca ggt acg ggg gct       192
Gly Leu Lys Asn Leu Ser Ser Asn Gly Lys Leu Ala Gly Thr Gly Ala
     50                  55                  60

ctc act ggc gaa gct tca gag ttg atg cct ggc tca aga aca tac agg       240
Leu Thr Gly Glu Ala Ser Glu Leu Met Pro Gly Ser Arg Thr Tyr Arg
 65                  70                  75                  80

aag gtt gac cct cct gac gta gag caa cta ggt aga tct tca tgg acg       288
Lys Val Asp Pro Pro Asp Val Glu Gln Leu Gly Arg Ser Ser Trp Thr
                 85                  90                  95

ctg tta cac tct gta gct gcc agc tat cct gct caa cct aca gac caa       336
Leu Leu His Ser Val Ala Ala Ser Tyr Pro Ala Gln Pro Thr Asp Gln
            100                 105                 110

cag aag ggt gaa atg aaa cag ttc ttg aat atc ttc tca cat att tat       384
Gln Lys Gly Glu Met Lys Gln Phe Leu Asn Ile Phe Ser His Ile Tyr
        115                 120                 125

cct tgc aac tgg tgt gct aaa gac ttt gaa aaa tat atc aga gaa aat       432
Pro Cys Asn Trp Cys Ala Lys Asp Phe Glu Lys Tyr Ile Arg Glu Asn
    130                 135                 140

gca cca caa gtt gag tca aga gaa gaa ctt ggg agg tgg atg tgt gaa       480
Ala Pro Gln Val Glu Ser Arg Glu Glu Leu Gly Arg Trp Met Cys Glu
145                 150                 155                 160
```

```
gcc cac aat aaa gtc aat aag aaa ttg agg aag ccc aaa ttt gac tgt        528
Ala His Asn Lys Val Asn Lys Lys Leu Arg Lys Pro Lys Phe Asp Cys
                165                 170                 175

aat ttc tgg gaa aaa aga tgg aag gac ggc tgg gac gaa                  567
Asn Phe Trp Glu Lys Arg Trp Lys Asp Gly Trp Asp Glu
            180                 185
```

<210> 2
<211> 567
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> CDS
<222> (1) ... (567)
<223> kodierende Sequenz der rekombinanten Sulfhydryloxidase Erv1p(C30S)

<400> 2

```
atg aaa gca ata gat aaa atg acg gat aat cca cca caa gaa ggc tta        48
Met Lys Ala Ile Asp Lys Met Thr Asp Asn Pro Pro Gln Glu Gly Leu
  1               5                  10                  15

agt ggg agg aaa ata ata tat gac gaa gat ggc aaa cct tcg cga tca        96
Ser Gly Arg Lys Ile Ile Tyr Asp Glu Asp Gly Lys Pro Ser Arg Ser
             20                  25                  30

tgt aac acc cta ctt gac ttt cag tac gtg acc ggg aag ata tct aat       144
Cys Asn Thr Leu Leu Asp Phe Gln Tyr Val Thr Gly Lys Ile Ser Asn
         35                  40                  45

ggc ctg aag aac ctc tca tct aac ggt aaa cta gca ggt acg ggg gct       192
Gly Leu Lys Asn Leu Ser Ser Asn Gly Lys Leu Ala Gly Thr Gly Ala
     50                  55                  60

ctc act ggc gaa gct tca gag ttg atg cct ggc tca aga aca tac agg       240
Leu Thr Gly Glu Ala Ser Glu Leu Met Pro Gly Ser Arg Thr Tyr Arg
 65                  70                  75                  80

aag gtt gac cct cct gac gta gag caa cta ggt aga tct tca tgg acg       288
Lys Val Asp Pro Pro Asp Val Glu Gln Leu Gly Arg Ser Ser Trp Thr
                 85                  90                  95

ctg tta cac tct gta gct gcc agc tat cct gct caa cct aca gac caa       336
Leu Leu His Ser Val Ala Ala Ser Tyr Pro Ala Gln Pro Thr Asp Gln
            100                 105                 110

cag aag ggt gaa atg aaa cag ttc ttg aat atc ttc tca cat att tat       384
Gln Lys Gly Glu Met Lys Gln Phe Leu Asn Ile Phe Ser His Ile Tyr
        115                 120                 125

cct tgc aac tgg tgt gct aaa gac ttt gaa aaa tat atc aga gaa aat       432
Pro Cys Asn Trp Cys Ala Lys Asp Phe Glu Lys Tyr Ile Arg Glu Asn
    130                 135                 140

gca cca caa gtt gag tca aga gaa gaa ctt ggg agg tgg atg tgt gaa       480
```

```
Ala Pro Gln Val Glu Ser Arg Glu Glu Leu Gly Arg Trp Met Cys Glu
145                 150                 155                 160

gcc cac aat aaa gtc aat aag aaa ttg agg aag ccc aaa ttt gac tgt        528
Ala His Asn Lys Val Asn Lys Lys Leu Arg Lys Pro Lys Phe Asp Cys
                165                 170                 175

aat ttc tgg gaa aaa aga tgg aag gac ggc tgg gac gaa                    567
Asn Phe Trp Glu Lys Arg Trp Lys Asp Gly Trp Asp Glu
            180                 185
```

<210> 3
<211> 567
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<220>
<221> CDS
<222> (1) ... (567)
<223> kodierende Sequenz der rekombinanten Sulfhydryloxidase Erv1p(C130S)

<400> 3

```
atg aaa gca ata gat aaa atg acg gat aat cca cca caa gaa ggc tta        48
Met Lys Ala Ile Asp Lys Met Thr Asp Asn Pro Pro Gln Glu Gly Leu
  1               5                  10                  15

agt ggg agg aaa ata ata tat gac gaa gat ggc aaa cct tgc cga tca        96
Ser Gly Arg Lys Ile Ile Tyr Asp Glu Asp Gly Lys Pro Cys Arg Ser
            20                  25                  30

tgt aac acc cta ctt gac ttt cag tac gtg acc ggg aag ata tct aat       144
Cys Asn Thr Leu Leu Asp Phe Gln Tyr Val Thr Gly Lys Ile Ser Asn
        35                  40                  45

ggc ctg aag aac ctc tca tct aac ggt aaa cta gca ggt acg ggg gct       192
Gly Leu Lys Asn Leu Ser Ser Asn Gly Lys Leu Ala Gly Thr Gly Ala
    50                  55                  60

ctc act ggc gaa gct tca gag ttg atg cct ggc tca aga aca tac agg       240
Leu Thr Gly Glu Ala Ser Glu Leu Met Pro Gly Ser Arg Thr Tyr Arg
65                  70                  75                  80

aag gtt gac cct cct gac gta gag caa cta ggt aga tct tca tgg acg       288
Lys Val Asp Pro Pro Asp Val Glu Gln Leu Gly Arg Ser Ser Trp Thr
                85                  90                  95

ctg tta cac tct gta gct gcc agc tat cct gct caa cct aca gac caa       336
Leu Leu His Ser Val Ala Ala Ser Tyr Pro Ala Gln Pro Thr Asp Gln
            100                 105                 110

cag aag ggt gaa atg aaa cag ttc ttg aat atc ttc tca cat att tat       384
Gln Lys Gly Glu Met Lys Gln Phe Leu Asn Ile Phe Ser His Ile Tyr
        115                 120                 125

cct tcg aac tgg tgt gct aaa gac ttt gaa aaa tat atc aga gaa aat       432
Pro Ser Asn Trp Cys Ala Lys Asp Phe Glu Lys Tyr Ile Arg Glu Asn
```

```
    130                 135                 140

gca cca caa gtt gag tca aga gaa gaa ctt ggg agg tgg atg tgt gaa        480
Ala Pro Gln Val Glu Ser Arg Glu Glu Leu Gly Arg Trp Met Cys Glu
145                 150                 155                 160

gcc cac aat aaa gtc aat aag aaa ttg agg aag ccc aaa ttt gac tgt        528
Ala His Asn Lys Val Asn Lys Lys Leu Arg Lys Pro Lys Phe Asp Cys
                165                 170                 175

aat ttc tgg gaa aaa aga tgg aag gac ggc tgg gac gaa                    567
Asn Phe Trp Glu Lys Arg Trp Lys Asp Gly Trp Asp Glu
            180                 185


<210> 4
<211> 573
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> CDS
<222> (1) ... (573)
<223> kodierende Sequenz der Sulfhydryloxidase Erv1

<400> 3

atg ggt gag aag cca tgg cag cca cta ctc cag agc ttc gag aaa cta        48
Met Gly Glu Lys Pro Trp Gln Pro Leu Leu Gln Ser Phe Glu Lys Leu
  1               5                  10                  15

tca aat tgc gtc caa act cat ctt tcc aat ttc atc ggc atc aag aat        96
Ser Asn Cys Val Gln Thr His Leu Ser Asn Phe Ile Gly Ile Lys Asn
             20                  25                  30

act cct cct agt tct caa tcc aca atc caa aac cca atc atc tcc ttg       144
Thr Pro Pro Ser Ser Gln Ser Thr Ile Gln Asn Pro Ile Ile Ser Leu
         35                  40                  45

gac tct tct ccg cca atc gca aca aac agt tcc agt ctt cag aaa ctt       192
Asp Ser Ser Pro Pro Ile Ala Thr Asn Ser Ser Ser Leu Gln Lys Leu
     50                  55                  60

cct ctc aag gac aag tct act ggt cct gtg act aaa gag gat ctc ggg       240
Pro Leu Lys Asp Lys Ser Thr Gly Pro Val Thr Lys Glu Asp Leu Gly
65                  70                  75                  80

aga gct aca tgg acg ttt ctt cac act ctt gct gcg cag tat cca gaa       288
Arg Ala Thr Trp Thr Phe Leu His Thr Leu Ala Ala Gln Tyr Pro Glu
                85                  90                  95

aaa cca aca agg cag caa aaa aag gat gtt aaa gag ctg atg acg ata       336
Lys Pro Thr Arg Gln Gln Lys Lys Asp Val Lys Glu Leu Met Thr Ile
            100                 105                 110

ctt tcc cga atg tat cct tgt aga gaa tgt gcg gat cac ttc aaa gaa       384
Leu Ser Arg Met Tyr Pro Cys Arg Glu Cys Ala Asp His Phe Lys Glu
        115                 120                 125
```

```
atc cta aga tcg aat ccc gca caa gct gga tct cag gag gaa ttc tca        432
Ile Leu Arg Ser Asn Pro Ala Gln Ala Gly Ser Gln Glu Glu Phe Ser
    130                 135                 140

cag tgg ctt tgc cat gta cac aac acc gta aat aga agt ttg ggg aaa        480
Gln Trp Leu Cys His Val His Asn Thr Val Asn Arg Ser Leu Gly Lys
145                 150                 155                 160

ttg gtg ttc cct tgc gag aga gtg gat gca aga tgg ggc aag tta gag        528
Leu Val Phe Pro Cys Glu Arg Val Asp Ala Arg Trp Gly Lys Leu Glu
                165                 170                 175

tgt gag cag aaa agt tgt gat ctc cat gga act tct atg gac ttt            573
Cys Glu Gln Lys Ser Cys Asp Leu His Gly Thr Ser Met Asp Phe
            180                 185
```

Patentansprüche

1. Rekombinante, FAD-abhängige Sulfhydryloxidase, in der mindestens ein Cysteinrest der Aminosäuresequenz derart mutiert wurde, dass das Absorptionssmaximum gegenüber dem Wildtypprotein verändert ist.

2. Sulfhydryloxidase gemäß Anspruch 1, die aus der Familie der Erv/Alr-Sulfhydryloxidasen ausgewählt wird.

3. Sulfhydryloxidase gemäß Anspruch 1 oder 2, wobei ein redoxaktiver Cysteinrest ersetzt wurde.

4. Sulfhydryloxidase gemäß einem der Ansprüche 1–3, wobei die Sulfhydryloxidase Erv1p aus Saccharomyces cerevisiae ist (SEQ ID Nr. 1).

5. Sulfhydryloxidase gemäß Anspruch 4, wobei der Cysteinrest an Position 30 (SEQ ID Nr. 2) oder an Position 130 (SEQ ID Nr. 3) durch einen Serinrest ersetzt wurde.

6. Sulfhydryloxidase gemäß einem der Ansprüche 1–3, wobei die Sulfhydryloxidase Erv1 aus Arabidopsis thaliana ist (SEQ ID Nr. 4).

7. Sulfhydryloxidase gemäß einem der Ansprüche 1–6, die ein Protein- oder Peptidaffinitätsepitop an ihrem N- und/oder C-Terminus aufweist.

8. Nukleinsäuremolekül, das eine Sulfhydryloxidase gemäß einem der Ansprüche 1–7 kodiert.

9. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 8, wobei das Nukleinsäuremolekül operativ mit einer regulatorischen Sequenz verknüpft ist, um die Expression des Nukleinsäuremoleküls zu ermöglichen.

10. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 9, wobei die regulatorische Sequenz eine Promotorsequenz und eine Transkriptionsterminationssequenz umfasst.

11. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 8–10, das in einem Vektor enthalten ist.

12. Wirtszelle, die ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 8–11 enthält.

13. Verfahren zur Herstellung einer Sulfhydryloxidase gemäß einem der Ansprüche 1–7, das umfasst:
(a) Klonieren eines Nukleinsäuremoleküls, das eine Sulfhydryloxidase kodiert, in einen geeigneten Vektor, und
(b) Einbringen des in (a) erhaltenen rekombinanten Vektors in eine geeignete Wirtszelle oder einen geeigneten Zellextrakt.

14. Zusammensetzung, die mindestens eine Sulfhydryloxidase gemäß einem der Ansprüche 1–7 enthält.

15. Verwendung einer Sulfhydryloxidase gemäß einem der Ansprüche 1–7 als regulierbarer Biokatalysator für die Synthese von Disulfidbrückenbindungen und deren Übertragung auf Substrate.

16. Verwendung einer Sulfhydryloxidase gemäß einem der Ansprüche 1–7 als Sensor/Indikator für Redox-

reaktionen.

17. Verwendung einer Sulfhydryloxidase gemäß einem der Ansprüche 1–7 als redox-reguliertes Pigment.

18. Verwendung einer Sulfhydryloxidase gemäß einem der Ansprüche 1–7 als Akzeptormolekül in Resonanzenergietransfer-Applikationen.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1:

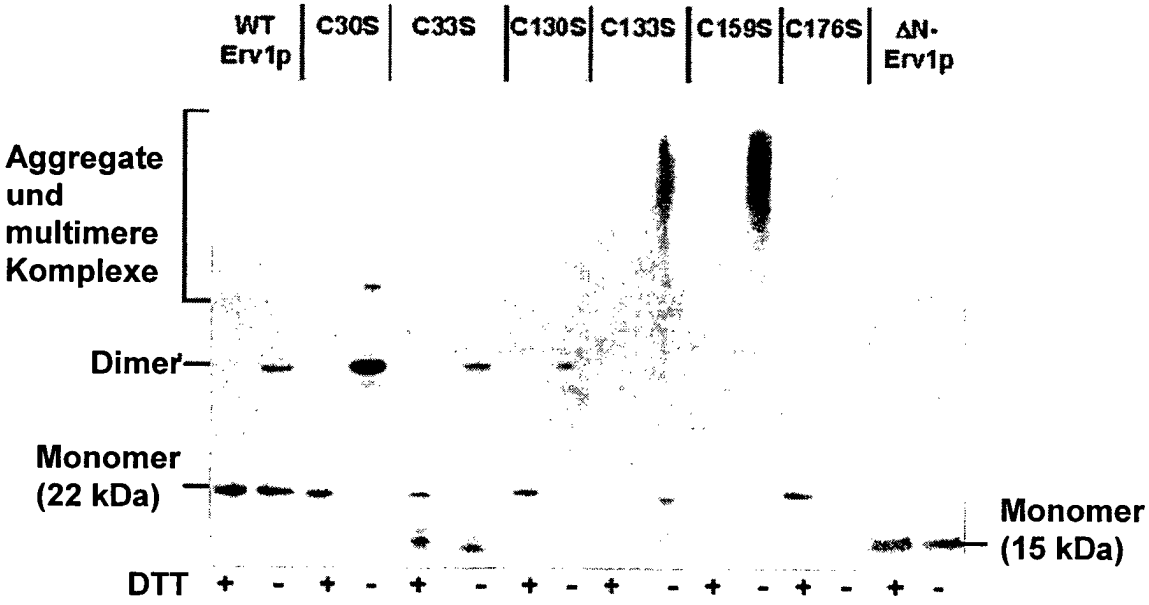


FIG. 2:

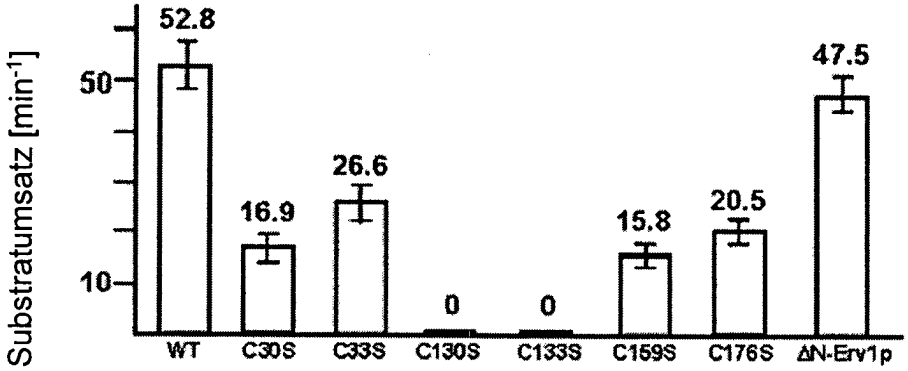


FIG. 3:

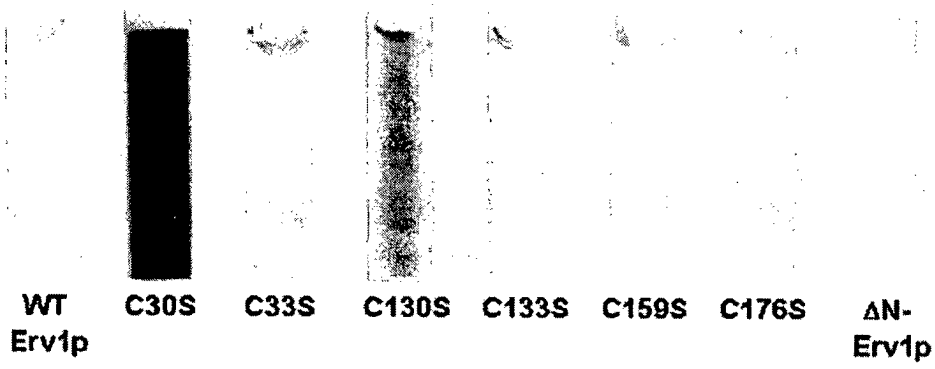
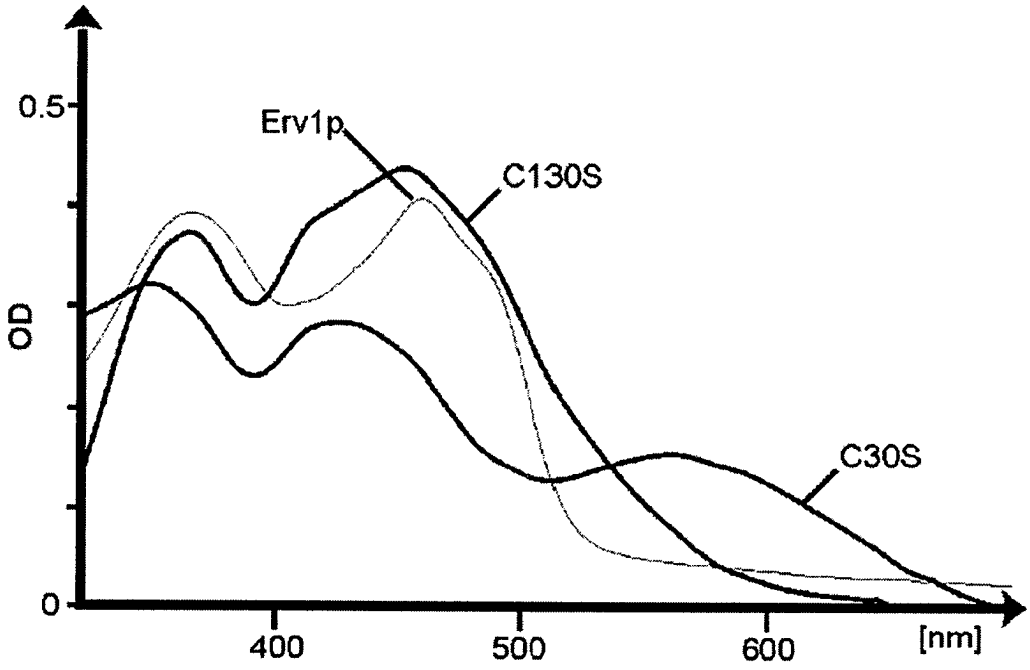

WT Erv1p
C30S
C33S
C130S
C133S
C159S
C176S
ΔN-Erv1p

FIG. 4:


0.5
0
OD
Erv1p
C130S
C30S
400
500
600
[nm]