

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b>  <b>C12Q 1/18, 1/68</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/61792</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 19. Oktober 2000 (19.10.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP00/02713  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 28. März 2000 (28.03.00)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 199 16 176.3      10. April 1999 (10.04.99)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-51368 Leverkusen (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> BRÖTZ, Heike [DE/DE]; Claudiusweg 9, D-42115 Wuppertal (DE). EHLERT, Kerstin [DE/DE]; Pahlkestrasse 5, D-42115 Wuppertal (DE). FREIBERG, Christoph [DE/DE]; Nüllerstrasse 85, D-42115 Wuppertal (DE). SPALTMANN, Frank [DE/US]; 1008 Massachusetts Avenue, Apt. #403, Cambridge, MA 02138 (US). WIELAND, Bernd [DE/DE]; Unterkirchen 38, D-42349 Wuppertal (DE). LABISCHINSKI, Harald [DE/DE]; Katemberger Schulweg 80, D-42113 Wuppertal (DE).  <b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; D-51368 Leverkusen (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> NOVEL ESSENTIAL BACTERIAL GENES AND THEIR PROTEINS		
<b>(54) Bezeichnung:</b> NEUE ESSENTIELLE BAKTERIELLE GENE UND IHRE PROTEINE		
<b>(57) Abstract</b>		
<p>The invention relates to nucleic acids and to protein sequences derived from said nucleic acids which possess functions that are essential to the survival of Escherichia coli. The invention also relates to vectors and host cells that have been transformed with these vectors for expressing essential proteins of the type described above and to proteins produced with these vectors. Finally, the invention also relates to the use of the proteins produced with these vectors in screening methods for identifying antibacterial substances and to the antibacterial substances found with these proteins.</p>		
<b>(57) Zusammenfassung</b>		
<p>Die Erfindung betrifft Nucleinsäuren und davon abgeleitete Proteinsequenzen, die für das Überleben von Escherichia coli essentielle Funktionen besitzen. Sie umfasst darüber hinaus Vektoren und mit diesen transformierte Wirtszellen zur Expression solcher essentiellen Proteine sowie die mit diesen Vektoren erzeugten Proteine. Sie umfasst weiter die Verwendung der mit diesen Vektoren erzeugten Proteine in Screeningverfahren zur Auffindung antibakterieller Substanzen sowie der mit diesen Proteinen gefundenen antibakteriellen Substanzen.</p>		

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Neue essentielle bakterielle Gene und ihre Proteine

Früher wurden neue innovative Antibiotika vor allem durch Modifikation und  
5 Optimierung bekannter Substanzklassen wie z.B.  $\beta$ -Lactame (Penicillin-Cephalo-  
sporine I-V) und Testen ihrer Wirkung auf Mikroorganismen in sogenannten MHK  
Testen erforscht und entwickelt.

10 Parallel wurde in den letzten Jahren die Suche nach neuen Wirkprinzipien mit Hilfe  
von biochemisch, mikrobiologisch gut charakterisierten Targets (Angriffspunkten)  
etabliert. Doch basierte die Auswahl von Targets nach diesen Methoden auf empi-  
rischem Vorgehen, was das Auffinden neuer Angriffspunkte sehr aufwendig ge-  
staltete.

15 In neuerer Zeit eröffnet die Kenntnis vollständiger Genomsequenzen von Pro- und  
Eukaryonten in Verbindung mit Methoden der Bioinformatik und Molekularbiologie  
die Möglichkeit zur systematischen und rationalen Auswahl antibakterieller Angriffs-  
punkte.

20 So wurde durch Analyse verschiedener bakterieller Genome eine große Anzahl Gene  
unbekannter Funktion entdeckt.

Unbekannte Proteine aus dem Gram-negativen Modellorganismus *Escherichia coli*  
(F. R. Blattner et al., *Science* 277: 1453-1462, 1997) tragen in der Regel Namen, die  
25 mit "Y" beginnen: z. B. YQGF. Einige Proteine unbekannter Funktion besitzen aber  
von dieser Systematik abweichende Namen, weil die für sie kodierenden Gene in der  
Nachbarschaft funktionell charakterisierter Gene liegen: z. B. KDTB (T. Clementz  
und C. R. H. Raetz, *J. Biol. Chem.* 266: 9687-9696, 1991; T. Clementz, *J. Bacteriol.*  
174: 7750-7756, 1992).

Vor dem Hintergrund der Auffindung von Antiinfektiva stellen Gene unbekannter Funktion und davon abgeleitete Proteine neue potentielle Angriffspunkte dar, wenn gezeigt werden kann, dass sie für das Überleben von Mikroorganismen essentiell sind (F. Argoni et al., Nature Biotechnology, 16:851, 1998; D. T. Moir et al., Antimicrob. Agents Chemother. 43: 439-446, 1999; US 5821076; B.J. Akerly et al., Proc. Natl. Acad. Si. USA 95: 8927-8932, 1998).

Zur Analyse der Essentialität solcher Gensequenzen für einen Organismus können Knockout - Technologien eingesetzt werden. Knockout Strategien basieren auf dem Austausch der intakten (Wildtyp-) Gensequenzinformation im Chromosom eines Bakteriums gegen eine durch Insertion oder Deletion zerstörte Gensequenz. Aus der Fähigkeit, nur mit einer intakten komplementären Kopie in der Zelle (auf einem Plasmid oder einer zweiten künstlichen Kopie im Chromosom) überlebensfähig zu sein, qualifiziert eine solche Gensequenz somit das kodierende Genprodukt als essentiell für diese Zelle.

Knockout-Versuche werden als Rekombinationsereignisse homologer DNA Sequenzen durchgeführt. Hierfür werden Vektoren benutzt, die steuerbar die Fähigkeit zur Replikation des Plasmids verlieren können, wie im Falle von temperatur-empfindlichen Replikons (pKO3, pMAK 700 oder pSC101) oder Vektoren, die in der gewünschten Zielzelle (E.coli) nicht replizieren können: z.B. Gram-positive Plasmide (pC194, pT181) in Gram-negativen Bakterien (E. coli). Integrationsvektoren wie pMAK700 tragen neben Sequenzen für das temperatursensitive Replikon zusätzlich Marker wie Antibiotikaresistenzen (z.B. Chloramphenicol), die zur Selektion auf plasmidtragende Zellen genutzt werden können.

Gegenstand der Erfindung sind Gene mit bisher unbekannter Funktion, deren Verbreitung im phylogenetisch diversen Bakterienreich aufzuzeigen und dabei insbesondere solche Gene zu selektieren, die keine oder allenfalls nur eine sehr entfernte Homologie in Eukaryonten besitzen, und für diese Gene ihre Essentialität für die Überlebensfähigkeit von Mikroorganismen nachzuweisen.

Ein weiterer Anspruch an die aufzufindenden Gene ist, durch geeignete Wahl der Suchstrategie nur diejenigen zu selektieren, deren abgeleitete Proteine aufgrund ihrer zu erwartenden physikochemischen Eigenschaften Wasserlöslichkeit erwarten lassen, damit diese vorteilhaft in zellfreien Assays verwendet werden können.

5

Aus dieser Analyse können Gensequenzen ausgewählt werden, die auf herkömmlichem Wege nicht als Angriffspunkt zur antibiotischen Wirkstofffindung ausgewählt worden wären.

10

Dazu werden im Rahmen der Erfindung die Genprodukte besagter Gene exprimiert und gereinigt. Die so erhaltenen neuen Proteine werden in Assays zur Auffindung von Agonisten und Antagonisten dieser Proteine verwendet. Darüber hinaus werden auch Über- oder Unter- expressionsmutanten für die entsprechenden Gene in Assays zur Auffindung von Agonisten und Antagonisten verwendet.

15

Die vorliegende Erfindung betrifft essentielle Gene, die die Proteine aus der Gruppe YQGF, YHBC, YGGJ, YGBP, YCHB, YGBB, YJEE, KDTB kodieren, und Gene aus anderen Mikroorganismen, die die entsprechenden orthologen Genprodukte kodieren, sowie Gene wie vorstehend angegeben, für die gezeigt werden kann, dass ihre steuerbare Ausschaltung zur Wachstumsinhibition des Wirtsorganismus führt, sowie Gene wie oben angegeben aus *Escherichia coli*, die Genprodukte kodieren, die zu 95-100 % identisch sind, und für die gezeigt werden kann, dass ihre steuerbare Ausschaltung zur Wachstumsinhibition des Wirtsorganismus führt, sowie Gene wie oben angegeben aus anderen Mikroorganismen, die orthologe Genprodukte kodieren, die zum entsprechenden Genprodukt aus *E. coli* 42-100 % identische oder konserviert ausgetauschte Aminosäuren besitzen, und für die gezeigt werden kann, dass ihre steuerbare Ausschaltung zur Wachstumsinhibition des Wirtsorganismus führt, sowie Gene, die als Bestandteil ihrer Nucleinsäuresequenz mindestens ein Gen aus der Gruppe der oben angegebenen Gene ganz oder teilweise enthalten, sowie die Genprodukte der oben angegebenen Gene.

20

25

30

Zum Umfang der Erfindung gehören weiter Vektoren, die eines oder mehrere der obengenannten Gene enthalten, sowie transformierte Mikroorganismen, die eines oder mehrere der obengenannten Gene enthalten, sowie die Verwendung konstruierter, rekombinanter Mikroorganismen, in denen eines der obengenannten Gene regulierbar exprimiert werden kann zur Auffindung von Substanzen, die an besagte Genprodukte binden, sowie die Verwendung der Genprodukte der oben angegebenen Gene in Assays zur Auffindung von Substanzen, die an besagte Genprodukte binden, sowie die Verwendung besagter Genprodukte in Assays, wobei besagte Assays auf dem Prinzip der Affinitätsselektion beruhen, sowie die Verwendung besagter Genprodukte von YQGF in Assays, wobei der Assay ein Flavinmononucleotid oder ein Flavinadenindinucleotid als Substrat verwendet, und ein Indikatorsystem, das den Redoxzustand des Proteins anzeigt, oder die Verwendung besagter Genprodukte von YQGF in Assays, wobei im Assay die hydrolytische Spaltung einer Phosphodiesterbindung oder einer anderen Esterbindung gemessen wird, sowie die Verwendung besagter Genprodukte von YJEE in Assays, wobei der Assay ein ATP/GTP als Substrat verwendet, sowie die Verwendung besagter Genprodukte von KDTB in Assays, wobei der Assay ein Nucleosidderivat als Substrat verwendet und dessen Phosphorylierung und/oder Dehydrogenierung gemessen wird, sowie die Verwendung besagter Genprodukte von YGBP in Assays, wobei der Assay ein Nucleosiddiphosphat-Derivat als Substrat verwendet und dessen Umsetzung gemessen wird, oder die Verwendung besagter Genprodukte von YGBP, wobei der Assay ein CDP-Sorbitol oder ein anderes Polyol-Substrat verwendet und dessen Pyrophosphorylyse gemessen wird bzw. wobei der Nucleotidtransfer an Sorbitol-1-phosphat oder ein anderes Polyolphosphat gemessen wird, sowie die Verwendung besagter Genprodukte von YGBB in Assays, wobei der Schlüsselschritt des Assays die hydrolytische Spaltung des Substrats ist, oder die Reduktion des Substrats mit NAD(P)H ist, sowie die Verwendung besagter Genprodukte von YCHB in Assays, wobei der Schlüsselschritt des Assays entweder eine Phosphorylierung oder eine Dehydrogenierung ist, sowie die Verwendung besagter Genprodukte von YHBC in Assays, wobei die Bindung an die DNA gemessen wird, sowie die Verwendung besagter Genprodukte

von YGGJ in Assays, wobei der Schlüsselschritt des Assays eine Phosphorylierung ist, sowie die Verwendung besagter Genprodukte oder die Verwendung von Teilen besagter Genprodukte zur Auffindung oder Herstellung von Antikörpern oder von anderen Proteinen, die an besagte Genprodukte binden. Zum Umfang der Erfindung gehört weiter die Verwendung von Substanzen, die besagte Genprodukte binden, zur Herstellung von Arzneimitteln, sowie die Verwendung von Substanzen, die besagte Genprodukte binden, zur Herstellung von antimikrobiell wirksamen Arzneimitteln, sowie die Verwendung besagter Genprodukte zum Auffinden von Substanzen, die an diese Genprodukte binden, sowie die Herstellung und Verwendung von Antisense-Konstrukten, gerichtet gegen die obengenannten Gene. Weiter gehören Verfahren zur Reinigung der besagten Genprodukte mit Hilfe von Antikörpern zum Umfang der Erfindung.

Die mit den vorstehend aufgeführten Verfahren aufgefundenen Substanzen, welche an die obengenannte Genprodukte binden, und die aus diesen Substanzen hergestellten Arzneimittel, können zur Behandlung von Infektionen, verursacht durch Krankheitserreger bei Mensch und Tier, verwendet werden.

Dies umfasst bevorzugt Erkrankungen, die durch bakterielle Krankheitserreger, ausgewählt aus den Familien der Bacillaceae, Bacteroidaceae, Chlamydiales, Enterobacteriaceae, Micrococcaceae, Mycobacteriaceae, Neisseriaceae, Pasteurellaceae, Pseudomonadaceae, Rickettsiaceae, Spirillaceae, Spirochaetaceae, Streptococcaceae und Vibrionaceae, verursacht werden.

Ganz besonders bevorzugt ist die Behandlung von Erkrankungen, die durch einen oder mehrere bakterielle Krankheitserreger ausgewählt aus den Gattungen *Porphyromonas gingivalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia prowazekii*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus*

mutans, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis* verursacht werden.

Die mit den vorstehend aufgeführten Verfahren aufgefundenen Substanzen, die an  
5 die obengenannten Genprodukte binden, und die aus diesen Substanzen hergestellten  
Arzneimittel, können bei Mensch und Tier zur Behandlung von Erkrankungen und  
insbesondere zur Behandlung von Infektionen verwendet werden, die das Blut; das  
Herz-Kreislaufsystem; das Zentralnervensystem und seine Anhangsgebilde; die  
Knochen, das Knochenmark; die Muskeln und Fascien, die Zähne; die Gelenke und  
10 deren Anhangsgebilde und Hohlräume; die inneren Organe, deren Hohlräume,  
inneren und äußeren Häute und Anhangsgebilde; den Magendarmtrakt und seine  
Hohlräume, inneren und äußeren Häute und Anhangsgebilde; die Haut, Hautan-  
hangsgebilde und Weichteile und deren Anhangsgebilde; das Urogenitalsystem und  
seine Anhangsgebilde; lokalisierte und/oder generalisierte Entzündungen und/oder  
15 generelle Bakteriämie und Sepsis, wie sie im Zusammenhang allgemeiner Er-  
krankung, Trauma, Polytrauma, und/oder nach chirurgischem Eingriff auftreten  
kann; opportunistische Infektionen und Sepsis auch im Zusammenhang mit anderen  
Erkrankungen wie Bluterkrankungen, Viruserkrankungen, konsumierenden Er-  
krankungen und/oder antineoplastischer und/oder immunsuppressiver Therapie,  
20 betreffen.

Beispielhaft können Erkrankungen behandelt werden, die nach Infektion mit  
*Porphyromonas gingivalis* im Bereich von Hals, Nase, Ohr, Kopf und Nacken, im  
Wundbereich der Mundhöhle nach chirurgischer und/oder zahnärztlicher Behand-  
25 lung, und/oder nach Bissen von Mensch und Tier; *Escherichia coli* im Bereich des  
Urogenitalsystems einschließlich der Harnwege, der Harnblase, der Niere, des  
Nierenbeckens, sowie Urosepsis und Sepsis nach operativen Eingriffen und anderen  
Traumen; *Staphylococcus aureus* als Erreger entzündlicher Erkrankungen der  
Atemwege und des Nasenrachenraumes, der Lunge, der Knochen, der Haut, der  
30 Hautanhangsgebilde und Weichteile, des Herzens und der Herzklappen, sowie durch  
die Erreger verursachte toxische Erkrankungen wie die Haemolyse des Blutes, die

Epidermolyse der Haut, die Enterokolitis des Magen-Darmtraktes, dem toxischen Schocksyndrom; *Mycobacterium tuberculosis* als Tuberkulose und/oder tuberkuloïder Erkrankungen der Lunge, der Haut, und anderer Organe und Organsysteme; *Neisseria gonorrhoeae* und dem daraus resultierenden Krankheitsbild der Gonorrhoe; 5 *Neisseria meningitidis* als Erreger bei akuter eitriger Meningitis; *Bordetella pertussis* als Erreger des Keuchhustens; *Haemophilus influenzae* als Erreger bei Meningitis, Epiglottitis, Osteomyelitis, Pneumonie, Septikämie, Laryngotracheitis, Pharyngitis, Sinusitis, Otitis media, septische Arthritis, akuter Endocarditis, Cellulitis; *Pseudomonas aeruginosa* und daraus resultierender Entzündung von Wunden, des 10 Urogenitaltraktes, der Herzinnenhäute, des Respirationstrakts, des Gastrointestinaltraktes; *Rickettsia prowazekii* und daraus resultierendem Fleckfieber; *Chlamydia trachomatis* und daraus resultierender Conjunktivitis granulosa trachomatosa des Auges; *Yersinia pestis* und daraus resultierender Pest-Erkrankung; *Campylobacter jejuni* und daraus resultierender entzündlicher Erkrankungen des Magen-Darmtrakts 15 wie Enteritis, Colitis, Proktitis sowie Ulkuserkrankung; *Helicobacter pylori* und daraus resultierender entzündlicher chronischer Erkrankungen des Magen-Darmtrakts wie Gastritis und *ulcus duodeni* sowie Ulkuserkrankung; *Borrelia burgdorferi* und daraus resultierender Lyme-disease und Erythema-Migrans Krankheit; *Treponema pallidum* und daraus resultierendem Krankheitsbild der Lues; *Enterococcus faecalis* 20 und daraus resultierender Erkrankung der Harnwege, des Urogenitalsystems, der Herzinnenhäute, sowie Wundinfektion; *Streptococcus mutans* und daraus resultierender Endocarditis und/oder Entzündung der Herzklappen; *Streptococcus pneumoniae* und daraus resultierender entzündlicher Erkrankungen der oberen und unteren Atemwege wie Pneumonie, Otitis media, Sinusitis, sowie Meningitis, Peritonitis, und Entzündungen der Herzinnenhäute und des Pericards, sowie der Karies; *Streptococcus* 25 *pyogenes* und daraus resultierender entzündlicher Erkrankungen des oberen Respirationstrakts wie Streptokokkenpharyngitis, Scharlach, Otitis media, sowie Pyodermie und Erysipel der Haut und Sepsis; *Vibrio cholerae* und dem daraus resultierenden Krankheitsbild der Cholera; *Bacillus subtilis* und dem daraus resultierenden Krankheitsbild der opportunistischen Infektionen, disseminierter Streuung und Sekundär- 30

infektionen im Rahmen anderer bakterieller Infektionen wie Otitis, Mastoiditis, Harnwegsinfekt, Bakteraemie, Meningitis, Endocarditis auftreten.

Bioinformatische Analyse verschiedener bakterieller Genome:

5 Die Aminosäuresequenzen der 4289 Proteine von *Escherichia coli* K12 MG1655 mit dem Genbank/EMBL-Eintrag U00096 wurden mit den Sequenzen der kompletten Proteinsätze vom Gram-positiven Modellorganismus *Bacillus subtilis* (Genbank/EMBL accession no. AL009126) und vom Gram-negativen Pathogen *Haemophilus influenzae* (Genbank/EMBL accession no. L42023) sowie mit allen  
10 anderen Aminosäuresequenzen der öffentlichen Datenbank (Genpept, Swiss-Prot) verglichen.

Vergleichende Analysen wurden mit dem Programm FASTA (FASTA vers. 2; Pearson and Lipman 1988) durchgeführt.

15

Alle *E. coli* Proteine mit signifikanter [Erwartungswert  $E(N) < 10^{-4}$ ] Sequenzhomologie zu Proteinen von *H. influenzae* und *B. subtilis* wurden ausgewählt.

Sequenzen, die zu Hefe-Proteinen (H.W. Mewes et al., Nature, suppl. Vol. 387: 9,  
20 1997) eine Homologie von einem Erwartungswert  $E(N) < 10^{-4}$  aufweisen, sowie alle Proteine mit bekannter Funktion oder mit Homologien zu bekannten Proteinen aus anderen Organismen wurden ausgeschlossen.

Weiter wurden die Proteine von *E. coli* ausgeschlossen, für die innerhalb der Spezies  
25 von *E. coli* selbst homologe Proteinsequenzen vorkommen [Erwartungswert  $E(N) < 10^{-4}$ ].

Darüber hinaus wurden Sequenzen mit mehr als einer vorhergesagten Transmembrandomäne [Programm: "Peptidestructure", Wisconsin Sequence Analysis  
30 Package (Vers. 9, Genetics Computer Group, Madison WI, USA)] ausgeschlossen.

Ergebnisse der bioinformatischen Analyse verschiedener bakterieller Genome:

Aus den so erhaltenen Sequenzen potentieller Targets wurden beispielhaft 27 Proteinsequenzen ausgewählt:

- 5 KDTB, SMPB, YBAB, YBAD, YBAK, YBAX, YBEA, YBEY, YCHB, YFGB, YGAG, YGBB, YGBP, YGGJ, YGGV, YHBC, YHBJ, YHBY, YHIN, YIBK, YIDA, YIGZ, YJEE, YJEQ, YQGF, YRAL, YRFI.

- 10 "Knockout"-Konstruktion und Essentialitätstests mit Hilfe temperatursensitiver Plasmide

## Material und Methoden

### 1. Bakterielle Stämme und Plasmide

15

Tabelle 1: verwendete E. coli Stämme

E. coli Stamm	Genotyp
E. coli W3110 F	lambda <sup>-</sup> IN(rrnD-rrnE)1 rph-1
E. coli MC1061	hsdR <sup>-</sup> mcrB <sup>-</sup> araD <sup>-</sup> 139 <sup>-</sup> delta(araABC-leu)7679 delta(lacX74) galU galK rpsL thi
E. coli MG1655	lambda <sup>-</sup> F <sup>-</sup>
E. coli XL1-BLUE	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac <sup>-</sup> F'[traD36 proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZ delta(M15)]
E. coli JM101	supE thi-1 ((lac-proAB)[F'traD36 proAB lacI <sup>q</sup> Z(M15)])

E. coli Stamm	Genotyp
E. coli TOP10	F <sup>-</sup> mrcA delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)Phi80lacZdeltaM15 delta(lacX74) deoR recA1 araD139 delta(araA-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG
E. coli M15 [pREP4]	nal <sup>s</sup> str <sup>s</sup> rif <sup>r</sup> lacI <sup>-</sup> ara <sup>-</sup> gal <sup>-</sup> mtl <sup>-</sup> F <sup>-</sup> recA <sup>+</sup> uvr <sup>-</sup> lon <sup>+</sup> pREP4 (ref. Quiagen, Hilden, Germany)

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Referenz
pMAK705	C.M. Hamilton et al. J.Bacteriol. 171: 4617-4622 (1989)
pKO3	A.J. Link et al. J. Bacteriol. 179: 6228-6237 (1997)
pAL761	pKO3 + NotI-1739-bp-Fragment mit 890 bp der Region stromabwärts von araD inklusive 108 bp des 3'-Endes von araD, mit einem 21-bp-Linker (5'-AGGCTAGCTTTAGCTCGAGGG-3'), der die Schnittstellen für NheI und XhoI enthält, und mit 828 bp der Region ab dem 14. bp stromaufwärts von araB. Die araB- bzw. araD-Regionen entstammen E. coli MG1655.
pCR-blunt	Invitrogen (Groningen, The Netherlands)
pBAD/HisA, HisB	Invitrogen (Groningen, The Netherlands)
PBluescript KS +/-	Stratagene, (Heidelberg, Germany)
pUC4K	enthält Kanamycin-Resistenzkassette (Genebank/EMBL Acc. No. X06404)
pBR322	enthält Tetracyclin-Resistenzkassette (Life Technologies, GibcoBRL, Eggenstein, Germany)

## Verwendete Nährmedien

## LB- (Luria-Bertani-) Medium

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl auf 1 l H<sub>2</sub>O

5

## M9-Minimal-Medium

6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g NaCl, 1 g NH<sub>4</sub>Cl auf 1 l H<sub>2</sub>O

Tabelle 3: Antibiotika-Konzentrationen in den verwendeten Medien

Antibiotikum	Konzentration
Chloramphenicol	20 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml
Ampicillin	100 µg/ml

10

## Molekularbiologische Techniken

## Molekularbiologische Grundtechniken

15 Molekularbiologische Grundtechniken wie Plasmidisolierung, Schneiden mit Restriktions-Endonukleasen, Modifikation von DNA (Dephosphorylierung, Auffüllreaktionen, Ligation), Herstellung kompetenter E. coli Zellen und Transformation sind mit dem Fachmann bekannten gängigen Vorschriften durchgeführt worden wie sie z.B. in J. Sambrook et al., Molecular Cloning, und Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, beschrieben werden.

20

## Polymerase – Ketten - Reaktion (PCR)

Alle benutzten PCR - Primer besaßen kalkulierte Schmelztemperaturen von 58°C bis 62°C.

25

Für Klonierungszwecke wurden folgende DNA-Polymerasen verwendet: Pwo-, Taq- (Boehringer, Mannheim, Germany), Akku-Taq- (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Germany) und Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg, Germany).

5

Gene bzw. deren flankierende Regionen wurden aus 100 ng chromosomaler DNA von E. coli W3110 F in einem Reaktionsvolumen von 25 bis 100 µl amplifiziert. Die Primerkonzentrationen betragen jeweils 1 µM und dNTP - Konzentrationen jeweils 250 µM. Fünfundzwanzig bis dreißig Reaktionszyklen von 30-60s bei 94°C, 30-60s bei 48-55°C und 1-3 min bei 72°C wurden mit einem abschließenden 5-Minuten-Schritt bei 72°C [ref.: PCR Protocols: a Guide to Method and Application, Ed. M. Innis et al., Academic Press (1990)] durchgeführt.

10

#### Assemblierungs-PCRs

15

Amplifizierte 5'- und 3'- flankierende Genregionen wurden fusioniert, indem jeweils 1 µl der beiden vorhergehenden PCR - Ansätze als Template für eine zweite PCR mit den distal lokalisierten Primern vermischt wurden. Diese PCR wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

20

#### Diagnostische Kolonie - PCRs

Diagnostische Kolonie - PCRs wurden mit einer Mischung aus Taq-DNA-Polymerase (Boehringer) und ThermoSequenase (Amersham) durchgeführt.

25

Jeweils eine Kolonie wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Davon wurden 5 µl für die PCR eingesetzt, die in einem 50-µl-Volumen unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt wurde.

#### Überexpression essentieller Proteine in E. coli

30

Zur Überexpression essentieller Proteine in E.coli sind verschiedene Vektorsysteme verwendet worden: pBAD/His (Invitrogen), pQE-Vektoren (Quiagen).

Es wurden pBAD/His-Plasmide (pUC-Vektor Derivate), die für regulierte, Dosis-abhängige Expression und Reinigung für rekombinante Proteine in E.coli konstruiert wurden, benutzt:

5 Das Vektorsystem pBAD/His beinhaltet die Sequenz, welche für sechs Histidine kodiert, inclusive eines Linkers zur Fusion mit dem N- bzw. C-Terminus des gewünschten rekombinanten Proteins. Die maximale Expression des löslichen, rekombinanten Proteins wird durch gezielte Aktivierung des araBAD Promotors mit Arabinose erreicht. Die Reinigung der Proteine wurde mit Hilfe von  
10 Affinitätschromatographie an Nickel-NTA-Agarose durchgeführt.

Zur Reinigung der Fusionsproteine müssen die Zellen, die das pBAD-Konstrukt enthalten, zunächst bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600nm}$ ) von 0,3 bis 0,6 angezüchtet werden. Dann wird mit Arabinose [0,002-0,2 % (w/v)] die gezielte  
15 Proteinproduktion gestartet und 2-3h weiter inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, das Zellpellet eingefroren. Zellaufschluss und Reinigungsprozedur wurden entsprechend "The QIAexpressionist, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, Quiagen, Hilden, Germany 1997" durchgeführt. Die Reinigungs-  
20 schritte wurden mit Polyacrylamidgelen (und anschließender Färbung mit Coomassie-Blau) kontrolliert.

Das Vektorsystem pQE beinhaltet die Sequenz, welche für sechs Histidine kodiert, inklusive eines Linkers zur Fusion mit dem N- bzw. C-Terminus des gewünschten  
25 rekombinanten Proteins. Die maximale Expression des löslichen, rekombinanten Proteins wird durch gezielte Aktivierung des Phagen T5 Promotor Systems und Induktion mit IPTG erreicht. Die Reinigung der Proteine wurde mit Hilfe von Affinitätschromatographie an Nickel-NTA-Agarose durchgeführt.

30 Zellanzucht und Reinigung der Fusionsproteine aus Zellen, die pQE-Konstrukte enthalten, wurden entsprechend der Vorschrift aus „The QIAexpressionist, A

handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, Quiagen, Hilden, Germany 1997“ durchgeführt.

#### Klonierungsstrategie

5

##### Knockout - Plasmide:

Um die Essentialität der offenen Leserahmen der ausgewählten Gene zu testen, wurden "Knockout"- Plasmide verwendet, die den temperatursensitiven Replikationsursprung von pSC101 besitzen. Das heißt: Diese Plasmide können sich bei 30°C in E. coli selbständig vervielfältigen, nicht aber bei 42-44°C. Werden DNA-Bereiche, die zum E. coli - Chromosom homolog sind, in solche Plasmide kloniert, so können diese Plasmide bei 42-44°C mit Hilfe homologer Rekombination gezielt in den zu untersuchenden Genlocus des E. coli – Chromosoms integrieren. Die anschließende Exzision des Plasmides bei 30° C kann zum Austausch der Wildtyp - Sequenz gegen die ursprünglich im Plasmid klonierte Sequenz führen.

10  
15

Die flankierenden Bereiche der untersuchten Gene im Bereich von jeweils 400-800 bp wurden in pMAK705 bzw. pKO3 kloniert. Anstelle des untersuchten Gens wurde entweder eine Tetracyclin- oder eine Kanamycin – Resistenz - Kasette in die jeweiligen Plasmide integriert. Für die Klonierungsstrategie wurden zwei Wege beschrieben:

20

##### Integration der Resistenzkasette in das Gen:

Das Gen von Interesse wurde inklusive seiner flankierenden Bereiche (400-800 bp) mittels PCR aus chromosomaler E.-coli-W3110-F-DNA amplifiziert und in einen Klonierungsvektor kloniert (pCR-blunt). Mit Hilfe von Restriktionsverdau und anschließenden Ligationen wurde der größte Teil des kodierenden Bereichs des Gens von Interesse durch eine Antibiotika - Kasette ersetzt, oder das Gen wurde durch eine solche Kasette unterbrochen (Tetracyclin bzw. Kanamycin-Resistenz-Kasette). Anschließend wurde die Kasette mit den das Gen ursprünglich flankierenden Sequenzen in das "Knockout"-Plasmid pMAK705 bzw. pKO3 kloniert.

25  
30

Klonierung von "In-frame"- Deletionen mit Integration einer Resistenzkassette:

DNA-Regionen mit Längen von 500 bis 800 bp, die das 5'- und 3'-Ende des jeweiligen Gens umgeben, wurden in zwei separaten PCR - Reaktionen aus chromosomaler E.-coli-W3110-F-DNA amplifiziert. Die dazu nötigen Primer wurden so ausgewählt, dass die Enden der PCR - Produkte, die die 5'- und 3'-Enden des Gens abdeckten, zusätzlich einen 21-bp-"Tag" mit ein oder zwei Restriktionsschnittstellen besaßen. Demnach enthielten die beiden PCR - Produkte zwei 21-bp lange, zueinander komplementäre Verlängerungen. Diese wurden verwendet, um beide Produkte in einem zweiten PCR - Schritt mit Hilfe der außen liegenden Primer zu assemblieren.

Über Restriktionsschnittstellen, die an den 5'-Enden der außen liegenden Primer eingebaut waren, konnte das Fusions - PCR - Produkt in pKO3 kloniert werden. Das Fusions - PCR - Produkt enthielt die flankierenden Bereiche (je 400-800 bp) sowie genau 18 Nukleotide des 5'-Endes und 36 Nukleotide des 3'-Endes des untersuchten Gens, wobei das 5'- und das 3'-Ende des Gens durch ein 21-bp-"Tag" unterbrochen waren. Auf diese Weise wurde eine sogenannte "In - Frame"-Deletion des Gens erzeugt. Über eine Restriktionsschnittstelle wurde in das 21-bp-"Tag" eine Kanamycin - Resistenz - Kassette integriert.

20

Temperatur -"Shift" - Experimente (Integration und Exzision)

Zur Integration von pMAK705 und pKO3-Konstrukten wurde E. coli JM101 bzw. E. coli MC1061 mit den Plasmiden nach Standardprotokollen transformiert und bei 43-44°C auf LB Agarplatten mit Chloramphenicol inkubiert.

25

Zur Ermöglichung der Exzision der Plasmide wurden die 43/44°C - Klone (Kointegrate) anschließend auf 30°C - LB überimpft. Je nach dem Vektorsystem (pMAK705 oder pKO3) wurden dabei unterschiedliche Wege beschritten:

Temperatur -"Shifts" mit pMAK705:

43/44°C-Klone wurden in 100 ml LB - Chloramphenicol Flüssigmedium überimpft und bei 30°C für 16h inkubiert. Nach zweimaliger Passage in frischem Medium mit erneuter Inkubation bei 30<sup>0</sup> für jeweils 16h wurden aus 1 ml der letzten gewachsenen Kultur die Plasmide isoliert. Die präparierten Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau auf das Vorhandensein der Wildtyp - Kopie des Gens im Plasmid untersucht. Die Kultur, in der positive Plasmide gefunden wurden, wurden auf LB - Chloramphenicol Platten bei 30°C vereinzelt.

5  
10 Eine Reihe von Kolonien wurden gepickt und zum Zwecke der Plasmidpräparation angezogen. Die präparierten Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau auf das Vorhandensein der Wildtyp - Kopie des Gens im Plasmid untersucht. Positive Klone wurden mittels PCR auf das Vorhandensein der Antibiotikaresistenz-Kassette im entsprechenden chromosomalen Locus verifiziert. Auf diese Weise wurde ein chromosomaler Knockout für das untersuchte Gen in E. coli erzeugt bei gleichzeitiger Komplementation durch eine funktionale Genkopie auf dem Plasmid pMAK705.

Temperatur -"Shifts" mit pKO3:

20 Die Kointegrate der pKO3-Derivate in E. coli MC1061 wurden herausgeschnitten bei gleichzeitiger Eliminierung des pKO3-Plasmids aus der Zelle entsprechend beschriebener Methode [A.J. Link et al., J. Bacteriol. 179: 6228-6237 (1997)]. Dabei wurden drei 43/44°C-Kolonien in Luria-Bertani (LB) - Medium verdünnt und auf LB-5 % (w/v) Saccharose – Kanamycin - Platten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden pro Integrationsklon 50 bis 100 der entstandenen Klone nochmals auf LB – Saccharose - Kanamycin- und LB – Chloramphenicol -Platten überimpft ("Replika - Plating"). Chloramphenicol - sensitive, aber Kanamycin - resistente Kolonien wurden schließlich mittels PCR analysiert, indem das Gen flankierende Primer verwendet wurden. Anhand der Größe des PCR-Produkts konnte gezeigt werden, ob der jeweilige Klon eine Kanamycin - Resistenz-Kassette anstelle

des Wildtyp - Gens besaß. Auf diese Weise wurde ein chromosomaler Knockout für das untersuchte Gen in E. coli ohne funktionale Komplementation erzeugt.

Essentialitätsbeweise:

5 Die Essentialität der Gene wurde auf unterschiedliche Weise gezeigt:

Essentialitätsbeweis mittels Temperaturshifts mit dem pMAK705 Vektorsystem:

10 Aus 5-ml der über-Nacht-LB-Chloramphenicol-Kulturen der jeweiligen komplementierten Knockout-Stämme, die am Ende der pMAK705-Experimente erhalten wurden, wurden Aliquots entnommen. Diese wurden auf eine einheitliche OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt. Verdünnungen davon wurden auf LB-Platten jeweils mit bzw. ohne Chloramphenicol ausplattiert und bei 30°C und 43/44°C über Nacht inkubiert.

15 Die Klone bilden auf LB-Chloramphenicol-Platten bei 43/44°C eine deutlich reduzierte Zahl an Kolonien aus im Vergleich zur Koloniezahl auf LB+/-Chloramphenicol bei 30°C, da der größte Teil der Klone bei 43/44°C das pMAK705-Konstrukt verliert und somit keine Resistenz gegenüber Chloramphenicol mehr ausbilden kann. Die Koloniezahl ist mindestens um den Faktor 10<sup>2</sup> reduziert. Unter diesen Bedingungen gelten die Klone als nicht überlebensfähig.

20

Kriterium für den chromosomalen Knockout in einem essentiellen Gen:

25 Klone, die nach der Kolonieauszählung auf LB ohne Chloramphenicol bei 43/44°C mindestens 10<sup>2</sup> weniger Kolonien bildeten als bei 30°C auf LB (mit oder ohne Chloramphenicol) und höchstens 10 mal mehr Kolonien bildeten als auf LB - Platten mit Chloramphenicol bei 43/44°C, besaßen nach unseren Kriterien einen chromosomalen Knockout in einem essentiellen Gen. Die Klone waren nicht lebensfähig, wenn ihnen das Plasmid bei 43/44°C auf LB ohne Chloramphenicol verloren ging (gemessen in "Zahl an überlebensfähigen Kolonien").

30 Hingegen besaßen all die Klone, die bei 43/44°C auf LB ohne Chloramphenicol ähnlich viele (+/- Faktor 10) Kolonien bildeten wie auf LB (mit und ohne Chlor-

amphenicol) bei 30°C, einen chromosomalen Knockout in einem nicht-essentiellen Gen. Die Entfernung des Plasmids mit der komplementierenden funktionalen Kopie aus den E. coli - Zellen auf LB ohne Chloramphenicol bei 43/44°C führt nicht zu einer Verringerung der Lebensfähigkeit der Klone (gemessen in "Zahl an überlebensch-

5 fähigen Kolonien").

Essentialitätsbeweis mittels Knockoutgenerierung ausschließlich in Gegenwart einer komplementierenden Genkopie (pKO3-System):

Die mit dem pKO3-Vektor-System erzeugten Klone, die Chloramphenicol - sensitiv waren und eine Kanamycin - Resistenz - Kasette anstelle des Wildtyp - Gens ent-

10 hielten, besaßen einen chromosomalen Knockout in einem nicht - essentiellen Gen. Eine plasmidkodierte Komplementation existierte nicht mehr.

Blieben alle Kolonien Chloramphenicol - resistent, konnte kein Knockout im

15 Chromosom erzeugt werden bei gleichzeitigem Verlust des Plasmids.

Zur weiteren Überprüfung der Essentialität dieser Gene wurde versucht, ein Knockout der entsprechenden Gene im Chromosom bei gleichzeitiger funktionaler Kom-

20 mentation zu erzeugen.

Dazu wurde der E. coli - Stamm MG1655 verwendet, der im Unterschied zu MC1061 einen vollständigen araBAD-Locus besitzt. Zuerst wurden die araBAD-

25 Gene von E. coli MG1655 durch die funktionale Kopie des jeweils zu untersuchenden Gens ersetzt. Dazu wurde das Plasmid pAL761 verwendet. Nach Transformation der pAL761-Derivate und folgenden Integrations- und Exzisionsschritten wurde der Austausch der araBAD-Gene gegen die funktionale Kopie eines Gens mittels PCR an den Klonen nachgewiesen, die nicht auf M9-Minimal-Medium mit 0,2 % (w/v) Arabinose wachsen konnten.

30 Positive Klone wurden im Folgenden mit dem pKO3-Derivat des entsprechenden Gens transformiert. Die anschließende Kointegration und Exzision wurde wie oben

beschrieben durchgeführt mit der Ausnahme, dass der Integrations- und Exzisionschritt in Anwesenheit von 0,2 % (w/v) Arabinose durchgeführt wurde.

5 Mittels PCR wurde unter den Chloramphenicol-sensitiven Kolonien der Genotyp des deletierten chromosomalen Genlocus mit Kanamycin-Kassette diagnostiziert. Zeigten die erhaltenen Klone eine Wachstumsabhängigkeit von Arabinose (d.h. keine Einzelkoloniebildung auf LB-Agarplatten ohne Arabinose im Gegensatz zum Wachstum auf LB-Agarplatten mit Arabinose), so galten die entsprechenden Gene als essentiell.

10 Essentialitätsbeweis mit Hilfe von "In - Frame"- Deletionen (pKO3-System):

In einigen Fällen ließ sich ein Austausch der Gene gegen entsprechende unterbrochene oder deletierte Kopien mit Antibiotika – Resistenz - Kassetten auch in Gegenwart einer Komplementation nicht erzeugen. Ursache hierfür können durch die Kassetten verursachte polare Effekte sein, die dazu führen, dass die Expression  
15 essentieller, stromabwärts vom untersuchten Gen lokalisierter Gene beeinträchtigt wird. Aus diesem Grunde wurden die oben beschriebenen "In - Frame"-Deletionsplasmide der entsprechenden Gene ohne Kanamycinkassette für die folgenden Experimente verwendet.

20 "In - Frame" - Deletionsklone wurden in E. coli MC1061 transformiert. Integration, Exzision und Eliminierung von pKO3 sowie das anschließende "Replika - Plating" wurden wie oben beschrieben durchgeführt mit der Modifikation, dass nicht mehr auf Kanamycin selektiert wurde. Die Chloramphenicol - sensitiven Kolonien sollten statistisch gesehen zu 50 % die Gen-Deletion tragen. Wenn unter 50 mittels PCR  
25 getesteten Kolonien, kein Klon die Deletion trug, schlossen sich weitere Experimente zur Bestätigung der Essentialität des untersuchten Gens an.

Dazu wurde eine Deletion des Gens im Chromosom bei gleichzeitiger Komplementation, wie oben beschrieben, erzeugt, und die Wachstumsabhängigkeit von  
30 Arabinose gezeigt.

Essentialitätsbeweis an komplementierten Knockouts ohne Arabinose-abhängiges Wachstum:

5 An den komplementierten Knockout – Stämmen, die kein Arabinose abhängiges Wachstum zeigten, wurde versucht, die funktionale Kopie des Gens im araBAD - Locus durch eine Kanamycinkassette zu ersetzen. Dazu wurden die entsprechenden Stämme mit pAL767 transformiert, einem pKO3-Derivat mit Kanamycin-Resistenzkassette und araBAD - flankierenden Regionen.

10 Waren nach Integration, Exzision und Eliminierung des pAL767 100 % der resultierenden Klone (200 betrachtete Klone) sowohl Kanamycin- als auch Chloramphenicol-resistent, wurde gezeigt, dass pAL767 immer noch im Chromosom integriert vorlag. Es war also nicht möglich, die intakte Kopie des Gens aus dem araBAD-Locus zu entfernen. Dieser Befund unterstreicht die Essentialität des  
15 betreffenden Gens. Konnte in den eventuell vorhandenen Kanamycin - resistenten und Chloramphenicol - sensitiven Klonen über PCR der erfolgreiche Austausch der funktionalen Genkopie gegen die Kanamycin - Resistenzkassette gezeigt werden, war das Gen nicht essentiell.

20

Ergebnisse der Essentialitätsbeweise:

Tabelle 4: Gene deren Essentialität nach den o.g. Methoden beurteilt wurde:

Knockout mit pMAK705-System:	
essentiell:	YJEE, KDTB
nicht - essentiell:	YHBY, YBAB, YBEY, YHIN, YJEQ, SMPB

25

Knockout mit pKO3-System:	
essentiell	YQGF, YGBP, YHBC, YGGJ, YGBB, YCHB
nicht-essentiell:	YBAK, YBAX, YGGV, YBAD, YIGZ, YRFI, YRAL, YFGB, YIDA, YIBK, YGAG, YHBJ, YBEA

Es wurden demnach aus den 27 untersuchten Genen acht essentielle Gene identifiziert. Mit den von diesen Genen abgeleiteten Proteinsequenzen wurde eine  
 5 Homologie-Suche gegen Nucleotidsequenzen vollständig und unvollständig entschlüsselter bakterieller Genome mit Hilfe des Programms TBLASTN durchgeführt.

Mit dieser Methode können durch Wahl eines Schwellenwertes, dem Erwartungswert  $P(N)$ , alle signifikant homologen Proteinsequenzen von zufällig übereinstimmenden  
 10 Sequenzen unterschieden werden. Unter Verwendung eines stringenten Schwellenwertes (Erwartungswert  $P(N) < 10^{-4}$ ) konnten Genprodukte mit einer signifikanten Sequenz-Homologie in einer großen Zahl krankheitsrelevanter Bakterien gefunden werden.

15 Aus den so aufgefundenen Homologen einer bakteriellen Spezies wurden als Ähnlichste diejenigen ausgewählt, die über die maximale Anzahl an identischen und/oder konserviert ausgetauschten Aminosäuren im Vergleich zum entsprechenden E. coli Protein verfügen (Tabelle 5). Solche Proteine werden als orthologe Proteine (Genprodukte) bezeichnet, da der Fachmann weiß, dass sie die gleiche Funktion ausüben  
 20 wie in Escherichia coli.

Die in Tabelle 5 aufgelisteten orthologen Proteine besitzen mindestens 21 % identische bzw. 42 % identische oder konserviert ausgetauschte Aminosäuren, d.h. 21 % Identität/42 % Ähnlichkeit .

Tabelle 5:

Verbreitung der orthologen Proteine der identifizierten essentiellen Genprodukte von E. coli in pathogenen Bakterien. Ergebnisse einer TBLASTN-Suche mit den für  
5 essentiell befundenen Proteinsequenzen aus E. coli gegen Nucleotidsequenzen vollständig oder unvollständig entschlüsselter bakterieller Genome wie sie zum Beispiel in der öffentlich zugänglichen Genomdatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) abgelegt sind: Kriterium für signifikante Homologie ist ein Erwartungswert  $P(N) < 10^{-4}$ . Die Identität und Ähnlichkeit der Orthologen im  
10 Vergleich zum entsprechenden E. coli Protein werden angegeben als %Identität/%Ähnlichkeit. Vollständig sequenzierte Genome sind mit (\*) markiert. Fehlende Homologie in unvollständig entschlüsselten Genomen ist mit einem (?) gekennzeichnet.

Organismus/ ORF	YJEE	KDTB	YQGF	YHBC	YGGJ	YGBP	YCHB	YGBB
<i>E. coli</i>	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100
<i>Haemophilus influenzae*</i>	55/74	52/73	70/81	55/73	63/76	53/71	58/72	64/72
<i>Yersinia pestis</i>	73/80	73/87	76/91	90/97	72/83	68/84	73/81	75/80
<i>Vibrio cholerae</i>	67/80	61/73	64/80	67/86	61/69	56/72	62/72	64/73
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58/70	61/80	50/67	49/69	43/59	46/61	52/65	60/67
<i>Bordetella pertussis</i>	44/61	52/74	47/65	39/59	35/52	32/45	47/60	48/56
<i>Neisseria meningitidis</i>	42/64	37/62	41/55	40/60	36/53	43/59	40/56	48/60
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	48/64	36/64	41/54	51/65	36/52	46/61	39/57	48/60
<i>Rickettsia prowazekii*</i>	31/54	-	31/50	43/67	28/49	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	33/58	48/72	34/51	41/64	26/48	25/45	26/48	43/58
<i>Helicobacter pylori*</i>	34/52	49/74	29/43	35/58	28/51	28/42	-	37/54
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	35/56	41/59	30/46	?	30/49	29/43	32/52	46/60
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	32/50	37/62	38/57	35/61	28/49	26/45	?	?
<i>Streptococcus pyogenes</i>	35/55	42/61	33/56	39/61	26/47	?	?	?
<i>Streptococcus mutans</i>	30/52	40/58	?	39/57	28/49	?	30/49	?
<i>Enterococcus faecalis</i>	?	44/70	36/57	40/62	26/44	21/44	32/52	44/59
<i>Staphylococcus aureus</i>	39/61	46/69	27/52	36/62	32/52	?	?	?
<i>Mycobacterium tuberculosis*</i>	35/50	44/67	28/43	34/58	24/44	33/48	36/52	32/44
<i>Bacillus subtilis*</i>	37/53	43/67	33/55	38/63	32/50	37/57	29/49	56/63
<i>Chlamydia trachomatis*</i>	41/55	-	27/43	-	-	31/48	34/53	29/44
<i>Borrelia burgdorferi*</i>	39/55	35/59	-	-	23/44	-	-	-
<i>Treponema pallidum*</i>	35/52	38/57	-	-	-	35/44	29/49	33/47

Aufgrund von Sequenzmotiven in der Aminosäureabfolge der acht essentiellen Genprodukte und/oder ihrer durch die Aminosäureabfolge zu erwartenden Raumstruktur lassen sich folgende Funktionen vorhersagen:

YJEE stellt wahrscheinlich ein ATP- oder GTP-bindendes Protein dar. Das Protein kann eine ATPase/GTPase- oder ATP-/GTP-Synthase-Aktivität besitzen.

5 KDTB ist wahrscheinlich ein Zucker- und/oder Nucleosid- und/oder Nucleosid-derivat-bindendes Protein mit Phosphorylierungs- oder Dehydrogenase-Aktivität.

YQGF stellt möglicherweise ein Flavin-Derivat-bindendes Protein dar. Es kann Flavomononucleotid (FMN) oder Flavinadeninucleotid (FAD) binden und Elektronen auf ein anderes Substrat/Protein übertragen. YQGF stellt möglicherweise  
10 eine Hydrolyse dar, die Phosphodiesterbindungen oder andere Esterbindungen spaltet.

YHBC ist ein putatives DNA-bindendes Protein mit modulatorischer/regulatorischer Funktion. YGGJ ist eine mögliche Phosphotransferase. Bei YGBP handelt es sich  
15 wahrscheinlich um eine Nucleosiddiphosphat-Derivat-Phosphorylase oder Pyrophosphorylase. Wahrscheinlich spaltet YGBP CDP-Sorbitol oder ein anderes Polyol-Nucleosiddiphosphat mit Hilfe von Pyrophosphat bzw. transferiert das Nucleotid-CMP an Sorbitol-1-phosphat oder ein anderes Polyolphosphat. YCHB ist eine putative Kinase oder eine putative Oxidoreduktase. YGBB ist eine putative Hydrolase  
20 oder NAD(P)H-abhängige Reductase.

## Beispiele

### Beispiel I zu YJEE

#### Konstruktion des Integrationsvektors mit der Gensequenz für yjeE

5

Dem Integrationsplasmid pMAK705 (5,5kb) ist es möglich, über homologe Rekombination in das Chromosom von E. coli JM101 zu integrieren. Das Plasmid enthält neben einem temperaturempfindlichen Replikations-Ursprung aus pSC101, ein Chloramphenicolresistenz - Gen zur Selektion des Plasmids im Wirtsorganismus.

10

Die kodierende Sequenz für yjeE sowie 420 Basenpaare(bp) stromaufwärts und 413bp stromabwärts der kodierenden Sequenz für yjeE wurden mit PCR amplifiziert (Cycler Perkin Elmer 480). 100ng chromosomale DNA aus E.coli W3110 F wurden in 25 Zyklen mit 45 sec. bei 94°C, 45 sec. bei 48°C und 3 min. bei 72°C sowie einer anschließenden Inkubation bei 72°C für 5 Minuten mit Pfu-DNA-Polymerase im Reaktionsvolumen von 100µl amplifiziert. Als Amplifikationsprimer wurden Primer A (5'-CCT GCT GGC AAT CAA TCC CGA TA-3') und Primer B (5'-AGG CGG TGG CGG CAC ATCGGC GTT-3') verwendet. Das Amplifikationsprodukt (1482bp) wurde nach Reinigung mit Qiaex (Qiagen, Hilden, Germany) in den Vektor pCR - blunt unter Verwendung des "pCR - blunt cloning kit" (Invitrogen Corporation, Carlsbad,CA) subkloniert. In die Restriktionsschnittstelle BpmI von pCR - blunt/yjee wurde eine Tetracyclin-Resistenzkassette hineinkloniert. Die Tetracyclinkassette wurde aus dem Plasmid pBR322 als 1400bp EcoRI/AvaI Fragment isoliert, und glatte Enden wurden mit Klenow Polymerase hergestellt.

25

Das so entstandene Plasmid pCR - blunt/yjeE::tet wurde mit KpnI/XbaI Restriktionsenzymen verdaut. Eine 2.8 kb große DNA- Bande wurde isoliert und in den mit KpnI/XbaI vorbehandelten Vektor pMAK705 (Wirtsorganismus E.coli JM101) kloniert.

30

Das entstandene Konstrukt (pMAK705yjee) wurde für die Integrationsexperimente verwendet.

#### **Herstellung und Analyse des yjeE Knockouts**

5 Zellen mit dem Plasmid pMAK705yjee wurden über Nacht in LB Medium bei 30°C angezüchtet und am nächsten Tag auf LB-Testplatten mit Chloramphenicol ausplattiert und 16 h bei 43°C inkubiert. Die Integration des Plasmids ins Chromosom von E.coli JM101 wurde durch Selektion Chloramphenicol-resistenter Kolonien, die bei 43°C wachsen konnten, identifiziert. Nach der Identifikation der Integration (bei  
10 43°C) wurden die Zellen in 100 ml LB Medium bei 30°C für 16 h inkubiert. Diese Zellen wurden zweimal in frisches Medium überführt und für jeweils 16 h weiter bei 30°C inkubiert.

Nach dieser Inkubationsserie wurden Plasmid-Schnellpräparationen von jeweils 1 ml  
15 der letzten Inkubationsansätze mit Qiaprep (Qiagen,Hilden,Germany) durchgeführt. Die präparierten Plasmide wurden mittels Restriktionsverdau auf das Vorhandensein der Wildtyp - Kopie des Gens im Plasmid untersucht. Zellen aus den Ansätzen, die positive Klone enthielten (yjeE Gen aus dem Wildtyp-Chromosom auf dem Plasmid), wurden auf LB-Platten mit Chloramphenicol bei 30°C vereinzelt.

20

Die Plasmid-DNA der vereinzelt Klone wurde erneut auf intaktes yjeE-Gen aus dem Chromsom getestet und positive Kolonien identifiziert. Die Integration der durch Insertion der Tetrazyclinkassette inaktivierten Kopie von yjeE im Chromosom wurde über PCR getestet.

25

Die so überprüften Klone konnten nun auf Essentialität des Targets yjeE für das Überleben der E.coli Zelle eingesetzt werden. Die Zellen wurden auf LB Testplatten mit und ohne Chloramphenicol bei 30° und 43°C inkubiert.

Tabelle 6: Zellzahlen der Inkubation +/-Chloramphenicol bei 30°C/43°C

	+Chloramphenicol	-Chloramphenicol
30°C	$1 \times 10^7$	$0,7 \times 10^7$
43°C	$1 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$

Wie aus der Tabelle ersichtlich, können die Zellen bei 30°C sowohl mit als auch  
 5 ohne Chloramphenicol wachsen. Bei 43°C ist das Wachstum sowohl mit Chloram-  
 phenicol als auch ohne Chloramphenicol drastisch, d.h. um den Faktor  $10^4$ , reduziert.  
 Dies zeigt deutlich die Notwendigkeit der Anwesenheit des Plasmids mit der  
 komplementierenden Sequenz von yjeE für das Wachstum der E. coli Zelle bei 43°C  
 ohne Chloramphenicol und somit die Essentialität von yjeE für das Überleben dieser  
 10 Zellen.

#### Beispiel: Essentialitätsbeweis für ygbP

#### Klonierung von "In-frame"- Deletionen mit bzw. ohne Integration einer Resistenzkassette:

15 DNA-Regionen, die das 5'- und 3'-Ende des Gens ygbP umgeben, wurden in zwei  
 separaten PCR - Reaktionen aus 100 ng chromosomaler E.-coli-W3110-F-DNA in  
 einem Reaktionsvolumen von 25 µl amplifiziert. Die Primerkonzentrationen  
 betragen jeweils 1 µM und dNTP - Konzentrationen jeweils 250 µM. Fünfund-  
 20 zwanzig Reaktionszyklen von 30s bei 94°C, 30s bei 52°C und 1-2 min bei 72°C  
 wurden mit einem abschließenden 5-Minuten-Schritt bei 72°C durchgeführt. Das  
 PCR-Produkt, das mit den Primern YGBP1A (5'-  
 cgcgatccCCACATGGTCACTGCCTGG-3') und YGBP1B (5'-  
 cccatccactaaactgcagctCAAATGAGTGGTTGCCATGTT-3') hergestellt wurde, um-  
 25 fasst 18 bp des 5'-Endes von ygbP und 776 bp der chromosomalen Region  
 stromaufwärts von ygbP. Das PCR-Produkt, das mit den Primern YGBP2A (5'-  
 agctgcagtttagtggatgggTACCTCACCCGAACCATCC-3') und YGBP2B (5'-

cgcggtaccACCTGGCAGCCTTCCAGTTG-3') hergestellt wurde, umfasst 36 bp des 3'-Endes von ygbP und 807 bp der chromosomalen Region stromabwärts von ygbP.

Die inneren Primer YGBP1B und YGBP2A enthielten an ihren 5'-Enden zusätzlich  
5 21mer-"Tags", die zueinander komplementär waren (kleine Buchstaben der oben  
erwähnten Sequenzen). Diese wurden verwendet, um beide PCR-Produkte in einem  
zweiten PCR - Schritt mit Hilfe der außen liegenden Primer YGBP1A und YGBP2B  
zu assemblieren. Dazu wurden jeweils 1 µl der beiden vorhergehenden PCR - An-  
sätze als Template für eine zweite PCR mit YGBP1A und YGBP2B vermischt. Diese  
10 PCR wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Das PCR-  
Produkt der erwarteten Größe wurde über eine Agarosegelelektrophorese mittels  
QIAEX (QIAGEN, Hilden, Germany) aufgereinigt.

Über die BamHI-Schnittstelle, die an den 5'-Enden der außen liegenden Primer  
15 YGBP1A und YGBP2B eingebaut waren (kleine Buchstaben der oben erwähnten  
Sequenzen), konnte das Fusions - PCR - Produkt in den BamHI-geschnittenen,  
dephosphorylierten pKO3 kloniert werden. Auf diese Weise wurde das Plasmid  
pAL759 erzeugt, das die "In - Frame"-Deletion von ygbP enthielt. Über die PstI-  
Schnittstelle im 21-bp-"Tag" (5'-ctgcag-3') wurde die Kanamycin - Resistenz -  
20 Kassette in pAL759 kloniert, die mittels eines PstI-Verdau aus pUC4K erhalten  
wurde. Das entstandene Konstrukt wurde als pAL759a bezeichnet.

#### **Temperatur -"Shifts" mit pAL759a:**

25 E. coli MC1061 wurde mit dem Plasmid pAL759a transformiert und bei 44°C auf  
LB Agarplatten mit Chloramphenicol inkubiert.

Drei der erhaltenen 44°C - Klone (Kointegrate) wurden in LB - Medium verdünnt,  
auf LB-5 % (w/v) Saccharose - Kanamycin - Platten ausplattiert und über Nacht  
30 inkubiert. Pro Integrationsklon wurden 100 der entstandenen Saccharose - Kanamy-  
cin - Klone nochmals auf LB - Saccharose - Kanamycin- und LB - Chloramphenicol

-Platten überimpft ("Replika - Plating") und bei 30°C über Nacht inkubiert. 100 % der Kanamycin-resistenten Klone waren gleichzeitig Chloramphenicol-resistent. Ein Austausch von ygbP gegen eine Kanamycin-Kassette konnte demnach nicht erfolgreich durchgeführt werden.

5

#### **Temperatur -"Shifts" mit pAL759:**

E. coli MC1061 wurde mit dem Plasmid pAL759 transformiert und bei 44°C auf LB Agarplatten mit Chloramphenicol inkubiert.

10

Drei der erhaltenen 44°C - Klone (Kointegrate) wurden in LB - Medium verdünnt, auf LB-5 % (w/v) Saccharose -Platten ausplattiert und über Nacht inkubiert.

Pro Integrationsklon wurden 100 der entstandenen Saccharose - Klone nochmals auf LB - Saccharose - und LB - Chloramphenicol -Platten überimpft ("Replika - Plating") und bei 30°C über Nacht inkubiert. Jeweils 50 Chloramphenicol - sensitive Kolonien wurden schließlich mittels PCR analysiert, indem YGBP1A und YGBP2B als Primer verwendet wurden. Anhand der Größe des PCR-Produkts konnte gezeigt werden, dass keiner der getesteten Klone die Deletion von ygbP besaß (PCR-Produkt bei ygbP-Deletion: 1637 bp). In allen Kolonien konnte der Wildtyp-Gen-Locus von ygbP amplifiziert werden (2294 bp). Ein Austausch von ygbP gegen eine Deletion konnte demnach nicht erfolgreich durchgeführt werden.

20

25

Erzeugung einer ygbP-Deletion in Gegenwart einer chromosomalen Komplementation:

30

Im nächsten Schritt wurde versucht, eine Deletion von ygbP im Chromosom bei gleichzeitiger funktionaler Komplementation zu erzeugen. Dazu wurde der E. coli - Stamm MG1655 verwendet, der im Unterschied zu MC1061 einen vollständigen araBAD-Locus besitzt. Zuerst wurden die araBAD-Gene von E. coli MG1655 durch die funktionale Kopie von ygbP ersetzt. Dazu wurde das Plasmid pAL763 verwendet.

Das Plasmid pAL763 wurde erzeugt, indem aus chromosomaler E.-coli-W3110-F-DNA mit den Primern YGBPR (5'-atcgctagcATCAGCCCCGGAATTAACATG-3') und YGBPT (5'-atcctcgagAATTCGCATTATGTATTCTCCTG-3') das vollständige Gen YGBP inklusive seiner ribosomalen Bindungsstelle (18 bp stromaufwärts vom 5'-Ende) und inklusive 8 bp stromabwärts vom 3'-Ende von ygbP amplifiziert wurde. Die Primer enthalten an ihren 5'-Termini die Restriktionsschnittstellen für XhoI (YGBPT) und NheI (YGBPR). Über die Schnittstellen wurde das PCR-Produkt in den Vektor pAL761 kloniert. Nach Transformation von E. coli MG1655 mit pAL763 und folgenden Integrations- und Exzisionsschritten (siehe oben) wurde der Austausch der araBAD-Gene gegen die funktionale Kopie von ygbP mittels PCR an den Klonen nachgewiesen, die nicht auf M9-Minimal-Medium mit 0,2 % (w/v) Arabinose wachsen konnten. Die diagnostische PCR wurde mit den Primern YGBPR (s. o.) und ARA2B (atcgcgccgcAAAGCCGTGCTCGCGC) durchgeführt. Der Primer ARA2B bindet in der 3'-Region 865 bp stromabwärts vom araD-Gen, so dass zusammen mit dem Primer YGBPR bei positiven Klonen ein 1655-bp-Produkt entstand. Positive Klone wurden im Folgenden mit dem "In-Frame"-Deletionsplasmid pAL759 transformiert. Die anschließende Kointegration und Exzision wurde wie oben beschrieben durchgeführt mit der Ausnahme, dass der Integrations- und Exzisionsschritt in Anwesenheit von 0,2 % (w/v) Arabinose durchgeführt wurde. Mittels PCR wurde unter den Chloramphenicol-sensitiven Kolonien der Genotyp des deletierten chromosomalen Genlocus diagnostiziert. Die ygbP-Deletions-Klone, die eine Arabinose-regulierbare ygbP-Kopie im araBAD-Locus enthielten, zeigten eine Wachstumsabhängigkeit von Arabinose. Auf LB-Agarplatten ohne Arabinose konnten keine Einzelkolonien gebildet werden, wobei Einzelkolonien auf LB-Agarplatten mit Arabinose erhalten wurden. Das Gen ygbP ist demnach essentiell.

### Beispiel 3

#### **Herstellung und Reinigung von rekombinantem YJEE Proteins**

Die Expression und Reinigung von YJEE-Protein ist mit dem pBAD/His –  
5 Vektorsystem (Invitrogen) durchgeführt worden. Die Sequenz von yjeE wurde aus  
100ng chromosomaler DNA aus E. coli W3110F 1min bei 94°C, 1 min. bei 52°C, 3  
min bei 72°C in 25 Zyklen mit Pfu-DNA-Polymerase im 100µl Reaktionsansatz  
amplifiziert. Als Primer wurden YJEE-START (5'-TGA AGA TCT AAT CGA GTA  
ATT CCG CTC CCT GAT-3') und YJEE-STOP (5'-TCA GAA TTC TTA ACC  
10 GGC TAA ACG CGC CAG CAA CAA TC-3') eingesetzt. Das 5'-Ende von YJEE-  
START enthält die Sequenz für das Restriktionsenzym BglII. Das 5'-Ende von  
YJEE-STOP enthält die Sequenz für EcoRI. Der PCR-Ansatz wurde in einem  
Agarosegel aufgetrennt und eine Bande bei 450bp ausgeschnitten. Anschließend  
wurde die Bande mit Qiaex (Qiagen, Hilden,Germany) isoliert und mit den  
15 Restriktionsenzymen BglII und EcoRI 3 h lang bei 37°C inkubiert.

Das so behandelte DNA-Fragment wurde in den mit BglII/EcoRI vorbehandelten  
Vektor pBAD/HisB kloniert [Wirtsorganismus: E.coli Stamm TOP10 (Invitrogen)].  
Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Plasmid-Isolierung der erhaltenen  
20 Transformanden und Restriktion mit EcoRI gezeigt. Der Klon mit dem Plasmid  
pBAD/HisB-YjeE30 ist für die Expression und Reinigung eingesetzt worden.

Die Anzucht und Aufreinigung von YjeE aus E. coli TOP 10 mit Plasmid  
pBAD/HisB-YjeE30 wurde nach der Vorschrift zur Reinigung von histidin-  
25 markierten Proteinen an Ni-NTA Agarose (The QIAexpressionist, A handbook for  
high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, Quiagen, Hilden,  
Germany 1997) durchgeführt. Die Induktion der YjeE-Expression wurde mit 0.02 %  
Arabinose(w/v) bei einer optischen Dichte der Kultur von  $OD_{600} = 0,5$  gestartet. Zur  
Elution des gebundenen Proteins wurden verschiedene Konzentrationen Imidazol  
30 verwendet (50,100,150 und 200 mM). Bei 150 mM wurde die höchste Ausbeute an  
Protein erhalten. Mit Polyacrylamidgel-Auftrennung und anschließender Coomassie-

Färbung wurde die Aufreinigung kontrolliert. Aus 1 l Anzuchtmedium (LB-Medium) konnten 10 mg Protein mit einem Reinheitsgrad >90 % isoliert werden.

#### Beispiel 4

#### 5 **Screening von Banken niedermolekularer chemischer Verbindungen mit Targets unbekannter Funktion basierend auf Affinitätsselektion und Massenspektrometrie**

10 Zur Auffindung von Inhibitoren für die Targetproteine mit unbekannter, aber für das bakterielle Überleben essentieller Funktion (wie z.B. YJEE) können Screeningverfahren eingesetzt werden, die Substanzbanken im Hinblick auf Affinität zum Protein testen. Eine Screening-Möglichkeit ist die Affinitätsselektion aus Substanzgemischen mit anschließender Detektion der Liganden im Massenspektrometer. Dazu müssen definierte Substanzgemische verwendet werden, aus denen mit Hilfe der Massen-

15 detektion einzelne Substanzen identifiziert werden können. Deshalb eignen sich für diese Screeningmethode insbesondere Substanzgemische, die aus kombinatorischen Synthesen hergestellt worden sind.

Ein Flüssig-Chromatographie-Elektrospray-Massenspektrometer dient als Screening-

20 apparat, wobei die HPLC-Säule durch eine Ultrafiltrationskammer ersetzt ist. Die Ultrafiltrationskammer besteht aus einer Filtrationseinheit, in der die Filterscheibe durch eine Ultrafiltrationsmembran (Ausschluss-Molekulargewicht 10 kDa) ersetzt ist. Massenspektren werden mit Hilfe eines Massenspektrometers (von Hewlett-Packard; Palo Alto, CA; "5989B MS Engine Quadrupole Mass Spectrometer")

25 erzeugt. Die Bedienung erfolgt wie beschrieben (vanBreemen et al., Pulsed Ultrafiltration Mass Spectrometry. A New Method for Screening Combinatorial: Anal. Chem., 69 [11], 2159-2164, 1997).

Ein äquimolares Gemisch von 96 Verbindungen (jeweils ca. 200 µM) in 10 µl

30 DMSO wird zu 90 µl 2 µM Protein (z. B. YJEE) gegeben, das in einem 20 mM Ammoniumacetat-Puffer vorliegt. Das Protein-Substanzgemisch wird mindestens

15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Injektion des Gemisches in die Ultrafiltrationskammer wird mit Wasser für 8 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 50 l/min gewaschen. Danach wird die mobile Phase zu Methanol/Wasser (50:50 v/v) verändert, um mögliche Liganden-Protein-Komplexe zu dissoziieren und die Liganden herauszufiltern. Die Liganden werden mit Hilfe der Elektrospray-Massenspektrometrie nachgewiesen. Die anhand ihrer Massenpeaks als mögliche Liganden identifizierten Substanzen aus einem 96-Gemisch werden als Einzelsubstanzen im Affinitätstest erneut eingesetzt, um ihre Affinität für das Targetprotein (z.B. YJEE) zu verifizieren.

10

### Beispiel 5

**Substanzen, die in der Affinitätsselektion auffallen, werden weiteren Prüfungen wie dem MHK-Test unterworfen.**

15

Dazu werden die MHK-Werte mit Hilfe der Mikrodilutionsmethode in BH-Medium bestimmt. Jede Prüfsubstanz wird im Nährmedium gelöst. In der Mikrotiterplatte werden durch serielle Verdünnung Konzentrationsreihen der Prüfsubstanzen angelegt. Zur Inokulation werden Übernachtskulturen der Erreger verwandt, die zuvor im Nährmedium 1:250 verdünnt werden. Zu 100 ml der verdünnten, wirkstoffhaltigen Nährlösungen werden je 100 ml Inokulationslösung gegeben.

20

Die Mikrotiterplatten werden bei 37°C bebrütet und nach ca. 20 Stunden oder nach 3 bis 5 Tagen abgelesen. Der MHK-Wert (mg/ml) gibt die niedrigste Wirkstoff-Konzentration an, bei der kein Wachstum zu erkennen ist.

25

Eine weitere Methode ist die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) im Flüssigdilutionstest. Übernachtskulturen der Testkeime (*S. aureus* 133) in Isosensitest-Bouillon werden 1:1000 in fötalem Kälberserum /FKS) oder Isosensitest-Bouillon verdünnt und mit Verdünnungen der Testsubstanzen (Verdünnungsstufen 1:2) inkubiert.

30

Die Kulturen werden bei 37°C für 18 bis 24 Stunden inkubiert. Die jeweils niedrigste Substanzkonzentration, bei der kein sichtbares Bakterienwachstum mehr auftritt, wird als MHK definiert.

- 5 Referenzen:  
Blattner et al. Science 277:1453-1462  
F. Argoni et al., Nature Biotechnology, 16:851 (1998)  
H.W. Mewes et al. Nature, suppl. Vol. 387, p 9 (1997)  
Hamilton et al. J.Bacteriol. 171: 4617-4622 (1989)
- 10 Link et al. J. Bacteriol. 179: 6228-6237 (1997)  
US 5821076 Identification of Essential Survival Genes  
B.J. Akerly et al. Proc. Natl. Acad. Si. USA 95: 8927-8932, 1998  
T. Clementz und C. R. H. Raetz: J. Biol. Chem. 266: 9687-9696, 1991  
T. Clementz, J. Bact. 1992 174: 7750-7756, 1992
- 15 D. T. Moir et al., Antimicrob. Agents Chemother. 43: 439-446, 1999;

**Patentansprüche:**

1. Verwendung der Proteine aus der Gruppe YQGF, YHBC, YGGJ, YGBP, YCHB, YGGB, YJEE, KDTB und deren orthologen Genprodukte in einem Assay zum Auffinden von Substanzen, die an diese Proteine binden.  
5
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die Proteine zu 95-100 % identisch mit den aufgeführten sind.
- 10 3. Vektoren enthaltend eines oder mehrere der Gene, die für die Proteine gemäß Anspruch 1 und 2 codieren.
4. Transformierte Mikroorganismen enthaltend eines oder mehrere der Gene, die für die Proteine gemäß Anspruch 1 und 2 codieren.  
15
5. Verbindungen, die an die Proteine gemäß Anspruch 1 und 2 binden.
6. Verbindungen, die an die Proteine gemäß Anspruch 1 und 2 binden und deren Aktivität modulieren.  
20
7. Arzneimittel enthaltend eine oder mehrere Verbindungen gemäß Anspruch 5 oder 6.
8. Verwendung von Verbindungen gemäß den Ansprüchen 5 und 6 zur Herstellung von Arzneimitteln.  
25
9. Verfahren zum Auffinden von Verbindungen, die Proteine aus der Gruppe YQGF, YHBC, YGGJ, YGBP, YCHB, YGGB, YJEE, KDTB und deren orthologen Genprodukte modulieren, dadurch gekennzeichnet, dass man die Verbindungen mit den Proteinen zusammenbringt und prüft, ob sie binden.  
30

10. Verfahren zum Auffinden von antibakteriell wirksamen Verbindungen, die Proteine aus der Gruppe YQGF, YHBC, YGGJ, YGBP, YCHB, YGBB, YJEE, KDTB und deren orthologen Genprodukte modulieren, dadurch gekennzeichnet, dass man die Verbindungen mit den Proteinen zusammen-  
5 bringt und prüft, ob sie binden und anschließend einem MHK-Test unterwirft.

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Bayer AG

<120> Neue essentielle Gene und ihre Proteine

<130> Essential Genes of EColi

<140>

<141>

<160> 28

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 153

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<223> YJEE

<400> 1

```

Met Met Asn Arg Val Ile Pro Leu Pro Asp Glu Gln Ala Thr Leu Asp
  1           5           10           15
Leu Gly Glu Arg Val Ala Lys Ala Cys Asp Gly Ala Thr Val Ile Tyr
           20           25           30
Leu Tyr Gly Asp Leu Gly Ala Gly Lys Thr Thr Phe Ser Arg Gly Phe
           35           40           45
Leu Gln Ala Leu Gly His Gln Gly Asn Val Lys Ser Pro Thr Tyr Thr
           50           55           60
Leu Val Glu Pro Tyr Thr Leu Asp Asn Leu Met Val Tyr His Phe Asp
           65           70           75           80
Leu Tyr Arg Leu Ala Asp Pro Glu Glu Leu Glu Phe Met Gly Ile Arg
           85           90           95
Asp Tyr Phe Ala Asn Asp Ala Ile Cys Leu Val Glu Trp Pro Gln Gln
           100          105          110
Gly Thr Gly Val Leu Pro Asp Pro Asp Val Glu Ile His Ile Asp Tyr
           115          120          125
Gln Ala Gln Gly Arg Glu Ala Arg Val Ser Ala Val Ser Ser Ala Gly
           130          135          140
Glu Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ala Gly
145           150

```

<210> 2

<211> 462

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<223> yjeE Position 3299..3760 in accession number  
AE000489; U00096

&lt;400&gt; 2

```

atgatgaatc gagtaattcc gctccctgat gagcaggcaa cattagacct gggcgagcgg 60
gtagcgaag cctgcatgg cgcaaccgta atctatctgt atggcgattt aggcgcaggt 120
aaaaccacct ttagccgggg ctttttacag gctctgggtc atcagggtaa tgtcaaaagc 180
cccacttata cgctggtcga accctatacg ctcgacaact taatgggtcta tcactttgat 240
ttgtaccgcc ttgccgatcc cgaggagctg gagtttatgg ggatccgcga ttattttgcc 300
aacgatgcca tctgctggt ggagtggcca caacaaggta cagggtgttct tcctgacccg 360
gatgtcgaaa tacacattga ttatcaggca caaggccgtg aggcgcgcgt gagtgccggt 420
tcctctgagg gtgaattggt gctggcgcgt ttagccggtt aa 462

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 159

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; KDTB

&lt;400&gt; 3

```

Met Gln Lys Arg Ala Ile Tyr Pro Gly Thr Phe Asp Pro Ile Thr Asn
  1           5           10           15

Gly His Ile Asp Ile Val Thr Arg Ala Thr Gln Met Phe Asp His Val
           20           25           30

Ile Leu Ala Ile Ala Ala Ser Pro Ser Lys Lys Pro Met Phe Thr Leu
           35           40           45

Glu Glu Arg Val Ala Leu Ala Gln Gln Ala Thr Ala His Leu Gly Asn
           50           55           60

Val Glu Val Val Gly Phe Ser Asp Leu Met Ala Asn Phe Ala Arg Asn
           65           70           75           80

Gln His Ala Thr Val Leu Ile Arg Gly Leu Arg Ala Val Ala Asp Phe
           85           90           95

Glu Tyr Glu Met Gln Leu Ala His Met Asn Arg His Leu Met Pro Glu
           100          105          110

Leu Glu Ser Val Phe Leu Met Pro Ser Lys Glu Trp Ser Phe Ile Ser
           115          120          125

Ser Ser Leu Val Lys Glu Val Ala Arg His Gln Gly Asp Val Thr His
           130          135          140

Phe Leu Pro Glu Asn Val His Gln Ala Leu Met Ala Lys Leu Ala
           145          150          155

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 480

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

<223> kdtB Position 1720..2199 of accession number  
AE000441; U00096

&lt;400&gt; 4

```

atgcaaaaaac gggcgattta tccgggtact ttcgatccca ttaccaatgg tcatatcgat 60
atcgtgacgc gcgccacgca gatgttcgat cacgttattc tggcgattgc cgccagcccc 120

```

agtaaaaaac cgatgtttac cctggaagag cgtgtggcac tggcacagca ggcaaccgcg 180  
 catctgggga acgtggaagt ggctggggtt agtgatttaa tggcgaactt cgcccgtaat 240  
 caacacgcta cgggtgctgat tcgtggcctg cgtgcggtgg cagattttga atatgaaatg 300  
 cagctggcgc atatgaatcg ccacttaatg ccggaactgg aaagtgtgtt tctgatgccg 360  
 tcgaaagagt ggctggttat ctcttcatcg ttggtgaaag aggtggcgcg ccatcagggc 420  
 gatgtcaccc atttctgccc ggagaatgtc catcagggcg tgatggcgaa gtttagcgtag 480

<210> 5

<211> 138

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<220>

<223> YQGF

<400> 5

Met Ser Gly Thr Leu Leu Ala Phe Asp Phe Gly Thr Lys Ser Ile Gly  
 1 5 10 15

Val Ala Val Gly Gln Arg Ile Thr Gly Thr Ala Arg Pro Leu Pro Ala  
 20 25 30

Ile Lys Ala Gln Asp Gly Thr Pro Asp Trp Asn Ile Ile Glu Arg Leu  
 35 40 45

Leu Lys Glu Trp Gln Pro Asp Glu Ile Ile Val Gly Leu Pro Leu Asn  
 50 55 60

Met Asp Gly Thr Glu Gln Pro Leu Thr Ala Arg Ala Arg Lys Phe Ala  
 65 70 75 80

Asn Arg Ile His Gly Arg Phe Gly Val Glu Val Lys Leu His Asp Glu  
 85 90 95

Arg Leu Ser Thr Val Glu Ala Arg Ser Gly Leu Phe Glu Gln Gly Gly  
 100 105 110

Tyr Arg Ala Leu Asn Lys Gly Lys Val Asp Ser Ala Ser Ala Val Ile  
 115 120 125

Ile Leu Glu Ser Tyr Phe Glu Gln Gly Tyr  
 130 135

<210> 6

<211> 417

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<223> yggF Position 11818...12234 of accession number  
 AE000377; U00096

<400> 6

atgagtggaa ccttactcgc cttcgacttc ggcaccaaaa gcattggcgt agcggctcggc 60  
 caacgcatta ccggcaccgc tcgccctttg cctgcaatta aagcacagga cggtagcggc 120  
 gactggaaca ttatcgagcg tttactgaaa gagtggcagc cggacgaaat catcgtcggc 180  
 ttgccgctga atatggacgg caccgagcaa ccattgactg ccagagcgcg taaatttgcc 240  
 aaccgtattc atggccgttt cgggtgttgaa gtaaagctcc atgacgagcg tcttagcact 300  
 gtggaagccc gttccggtct gtttgaacag ggcggctatc gggcgctcaa caaaggcaaa 360  
 gttgactctg cctctcgcgg tattattctc gaaagctatt tcgagcaggg atattaa 417

<210> 7

<211> 252

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; YGGJ

&lt;400&gt; 7

Met Gly Arg Arg Arg Gly Phe Leu Thr Met Arg Ile Pro Arg Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 His Pro Glu Pro Leu Thr Ser His Ser His Ile Ala Leu Cys Glu Asp  
 20 25 30  
 Ala Ala Asn His Ile Gly Arg Val Leu Arg Met Gly Pro Gly Gln Ala  
 35 40 45  
 Leu Gln Leu Phe Asp Gly Ser Asn Gln Val Phe Asp Ala Glu Ile Thr  
 50 55 60  
 Ser Ala Ser Lys Lys Ser Val Glu Val Lys Val Leu Glu Gly Gln Ile  
 65 70 75 80  
 Asp Asp Arg Glu Ser Pro Leu His Ile His Leu Gly Gln Val Met Ser  
 85 90 95  
 Arg Gly Glu Lys Met Glu Phe Thr Ile Gln Lys Ser Ile Glu Leu Gly  
 100 105 110  
 Val Ser Leu Ile Thr Pro Leu Phe Ser Glu Arg Cys Gly Val Lys Leu  
 115 120 125  
 Asp Ser Glu Arg Leu Asn Lys Lys Leu Gln Gln Trp Gln Lys Ile Ala  
 130 135 140  
 Ile Ala Ala Cys Glu Gln Cys Gly Arg Asn Arg Val Pro Glu Ile Arg  
 145 150 155 160  
 Pro Ala Met Asp Leu Glu Ala Trp Cys Ala Glu Gln Asp Glu Gly Leu  
 165 170 175  
 Lys Leu Asn Leu His Pro Arg Ala Ser Asn Ser Ile Asn Thr Leu Pro  
 180 185 190  
 Leu Pro Val Glu Arg Val Arg Leu Leu Ile Gly Pro Glu Gly Gly Leu  
 195 200 205  
 Ser Ala Asp Glu Ile Ala Met Thr Ala Arg Tyr Gln Phe Thr Asp Ile  
 210 215 220  
 Leu Leu Gly Pro Arg Val Leu Arg Thr Glu Thr Thr Ala Leu Thr Ala  
 225 230 235 240  
 Ile Thr Ala Leu Gln Val Arg Phe Gly Asp Leu Gly  
 245 250

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 759

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;220&gt;

<223> yggJ Position 9425..10813 of accession number  
 AE000377; U00096



<210> 10  
 <211> 459  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

<220>  
 <223> yhbC Position complement 14177..14635 of accession  
 number AE000397; U00096

<400> 10  
 gtgggcttgt ccacattaga gcaaaaatta acagagatga ttactgcgcc agttgaggcc 60  
 ctgggttttg aactggttgg catcgaattt attcgcggtc gcacatccac actgcgcatc 120  
 tatattgata gtgaagatgg catcaatggt gatgattgtg ctgatgtgag ccaccaggta 180  
 agtgctgtgc tggatgttga agatcccac accgttgctt ataacctgga agtctcctca 240  
 ccgggtctcg atcgcccact gttcacggct gaacactacg cccgttttgt cggagaagag 300  
 gtgactctgg ttctccgtat ggcggtacaa aaccgtcgta aatggcaggg cgttatcaaa 360  
 gcggtagacg gtgaaatgat cacagttacc gtcgaaggta aagatgaagt gttcgcgctg 420  
 agtaatatcc agaaggcgaa cctggttccc cacttttaa 459

<210> 11  
 <211> 236  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<220>  
 <223> YGBP

<400> 11  
 Met Ala Thr Thr His Leu Asp Val Cys Ala Val Val Pro Ala Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Phe Gly Arg Arg Met Gln Thr Glu Cys Pro Lys Gln Tyr Leu Ser Ile  
 20 25 30  
 Gly Asn Gln Thr Ile Leu Glu His Ser Val His Ala Leu Leu Ala His  
 35 40 45  
 Pro Arg Val Lys Arg Val Val Ile Ala Ile Ser Pro Gly Asp Ser Arg  
 50 55 60  
 Phe Ala Gln Leu Pro Leu Ala Asn His Pro Gln Ile Thr Val Val Asp  
 65 70 75 80  
 Gly Gly Asp Glu Arg Ala Asp Ser Val Leu Ala Gly Leu Lys Ala Ala  
 85 90 95  
 Gly Asp Ala Gln Trp Val Leu Val His Asp Ala Ala Arg Pro Cys Leu  
 100 105 110  
 His Gln Asp Asp Leu Ala Arg Leu Leu Ala Leu Ser Glu Thr Ser Arg  
 115 120 125  
 Thr Gly Gly Ile Leu Ala Ala Pro Val Arg Asp Thr Met Lys Arg Ala  
 130 135 140  
 Glu Pro Gly Lys Asn Ala Ile Ala His Thr Val Asp Arg Asn Gly Leu  
 145 150 155 160  
 Trp His Ala Leu Thr Pro Gln Phe Phe Pro Arg Glu Leu Leu His Asp  
 165 170 175  
 Cys Leu Thr Arg Ala Leu Asn Glu Gly Ala Thr Ile Thr Asp Glu Ala

180 185 190

Ser Ala Leu Glu Tyr Cys Gly Phe His Pro Gln Leu Val Glu Gly Arg  
 195 200 205

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

Phe Tyr Leu Thr Arg Thr Ile His Gln Glu Asn Thr  
 225 230 235

<210> 12  
 <211> 711  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

<220>  
 <223> ygbP Position complement 6754..7464 of accession  
 number AE000358; U00096

<400> 12

atggcaacca ctcatttggga tgtttgcgcc gtggttccgg cggccgggatt tggccgctcga 60  
 atgcaaaccg aatgtcctaa gcaatatctc tcaatcggta atcaaaccat tcttgaacac 120  
 tcggtgcatg cgctgctggc gcatccccgg gtgaaacgtg tcgtcattgc cataagtcct 180  
 ggcgatagcc gttttgcaca acttcctctg gcgaatcac cgcaaatac cgttgtagat 240  
 ggcggtgatg agcgtgccga ttccgtgctg gcaggctga aagccgctgg cgacgcgcag 300  
 tgggtattgg tgcattgacg cgctcgtcct tgtttgcatc aggatgacct cgcgcgattg 360  
 ttggcgttga gcgaaaccag ccgcacgggg gggatcctcg ccgcaccagt gcgcgatact 420  
 atgaaacgtg ccgaaccggg caaaaatgcc attgctcata ccggtgatcg caacggctta 480  
 tggcacgcgc tgacgccgca attttccct cgtgagctgt tacatgactg tctgacgcgc 540  
 gctctaaatg aaggcgcgac tattaccgac gaagcctcgg cgctggaata ttgctgattc 600  
 catcctcagt tggtcgaagg ccgtgctgat aacattaaag tcacgcgccc ggaagatttg 660  
 gcactggccg agttttacct caccgaacc atccatcagg agaatacata a 711

<210> 13  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

<220>  
 <223> YGBB

<400> 13

Met Arg Ile Gly His Gly Phe Asp Val His Ala Phe Gly Gly Glu Gly  
 1 5 10 15

Pro Ile Ile Ile Gly Gly Val Arg Ile Pro Tyr Glu Lys Gly Leu Leu  
 20 25 30

Ala His Ser Asp Gly Asp Val Ala Leu His Ala Leu Thr Asp Ala Leu  
 35 40 45

Leu Gly Ala Ala Ala Leu Gly Asp Ile Gly Lys Leu Phe Pro Asp Thr  
 50 55 60

Asp Pro Ala Phe Lys Gly Ala Asp Ser Arg Glu Leu Leu Arg Glu Ala  
 65 70 75 80

Trp Arg Arg Ile Gln Ala Lys Gly Tyr Thr Leu Gly Asn Val Asp Val  
 85 90 95

Thr Ile Ile Ala Gln Ala Pro Lys Met Leu Pro His Ile Pro Gln Met



Asp Glu Leu Ala Glu Met Gly Leu Thr Leu Gly Ala Asp Val Pro Val  
 130 135 140

Phe Val Arg Gly His Ala Ala Phe Ala Glu Gly Val Gly Glu Ile Leu  
 145 150 155 160

Thr Pro Val Asp Pro Pro Glu Lys Trp Tyr Leu Val Ala His Pro Gly  
 165 170 175

Val Ser Ile Pro Thr Pro Val Ile Phe Lys Asp Pro Glu Leu Pro Arg  
 180 185 190

Asn Thr Pro Lys Arg Ser Ile Glu Thr Leu Leu Lys Cys Glu Phe Ser  
 195 200 205

Asn Asp Cys Glu Val Ile Ala Arg Lys Arg Phe Arg Glu Val Asp Ala  
 210 215 220

Val Leu Ser Trp Leu Leu Glu Tyr Ala Pro Ser Arg Leu Thr Gly Thr  
 225 230 235 240

Gly Ala Cys Val Phe Ala Glu Phe Asp Thr Glu Ser Glu Ala Arg Gln  
 245 250 255

Val Leu Glu Gln Ala Pro Glu Trp Leu Asn Gly Phe Val Ala Lys Gly  
 260 265 270

Ala Asn Leu Ser Pro Leu His Arg Ala Met Leu  
 275 280

<210> 16  
 <211> 852  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

<220>  
 <223> ychB Position complement 5720..6571 of accession  
 number AE000219; U00096

<400> 16  
 atgcggacac agtggccctc tccggcaaaa cttaatctgt ttttatacat taccggtcag 60  
 cgtgcggatg gttaccacac gctgcaaacg ctgtttcagt ttcttgatta cggcgacacc 120  
 atcagcattg agcttcgtga cgatggggat attcgtctgt taacgcccggt tgaaggcgtg 180  
 gaacatgaag ataacctgat cgttcgcgca gcgcgattgt tgatgaaaac tgcggcagac 240  
 agcgggcgtc ttccgacggg aagcgggtgcg aatatcagca ttgacaagcg tttgccgatg 300  
 ggcggcggtc tcggcggtgg ttcattcaat gccgcgacgg tcctggtggc attaaatcat 360  
 ctctggcaat gcgggctaag catggatgag ctggcggaat tggggctgac gctggggcga 420  
 gatgttcctg tctttgttcg ggggcatgcc gcgtttgccg aaggcgttgg tgaataacta 480  
 acgccggtgg atccgccaga gaagtgggat ctggtggcgc accctggtgt aagtattccg 540  
 actccggtga tttttaaaga tcttgaactc ccgcgcaata cgccaaaaag gtcaatagaa 600  
 acgttgctaa aatgtgaatt cagcaatgat tgcgagggta tcgcaagaaa acgttttcgc 660  
 gaggtgatg cggtgctttc ctggctgtaa gaatacggcc cgtcgcgcct gactgggaca 720  
 gggcgctgat tcttgctgga atttgataca gagtctgaag cccgccaggt gctagagcaa 780  
 gcccgggaat ggctcaatgg ctttgtggcg aaaggcgcta atctttcccc attgcacaga 840  
 gccatgcttt aa 852

<210> 17  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

<220>  
<223> 21-bp-Linker-Sequenz aus dem Plasmid pAL761

<400> 17  
aggctagctt tagctcgagg g 21

<210> 18  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<220>  
<223> Primer A

<400> 18  
cctgctggca atcaatcccg ata 23

<210> 19  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<220>  
<223> Primer B

<400> 19  
aggcgggtggc ggcacatcgg cgtt 24

<210> 20  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<220>  
<223> Primer YGBP1A

<400> 20  
cgcggatccc cacatggtca ctgcctgg 28

<210> 21  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<220>  
<223> Primer YGBP1B

<400> 21  
cccatccact aaactgcagc tcaaatgagt ggttgccatg tt 42

<210> 22  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<220>  
<223> Primer YGBP2A

<400> 22  
agctgcagtt tagtggatgg gtacctcacc cgaaccatcc 40

<210> 23  
<211> 29

<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<220>  
<223> Primer YGBP2B

<400> 23  
cgcggatcca cctggcagcc ttccagttg 29

<210> 24  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<220>  
<223> Primer YGBPR

<400> 24  
atcgctagca tcagcccggg aattaacatg 30

<210> 25  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<220>  
<223> Primer YGBPT

<400> 25  
atcctcgaga attcgatta tgtattctcc tg 32

<210> 26  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<220>  
<223> Primer ARA2B

<400> 26  
atcgcgggccg caaagccgtg ctcgcgc 27

<210> 27  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<220>  
<223> Primer YJEE-START

<400> 27  
tgaagatcta atcgagtaat tccgctccct gat 33

<210> 28  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli

<220>  
<223> Primer YJEE-STOP

<400> 28  
tcagaattct taaccggcta aacgcgccag caacaatc 38

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/02713

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPK 7 C12Q1/18 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) IPK 7 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 practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 42875 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 1 October 1998 (01.10.00) page 21, line 28-page 22, line 13 page 27, line 6-page 30, line 21 claims 7-11; figure 4; example 2,4	1-4,9,10
A	ARIGONI F ET AL: "A genome-based approach for teh identification of essential bacterial genes" NATURE BIOTECHNOLOGY,US,NATURE PUBLISHING, volume.16, No.16, September 1998 (09.98) pages 851-856-856, XP002124132 ISSN: 1087-0156 cited in the application page 855, column 1, paragraph 4-column 2, paragraph 1; table 2	1-4,9,10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family 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 14 June 2000(14.06.00)		Date of mailing of the international search report 15 September 2000(15.09.00)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office Facsimile No.		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP00/02713

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BALTZ ET AL: "DNA sequence sampling of the Streptococcus pneumoniae genome to identify novel targets for antibiotic development" MICROBIAL DRUG RESISTANCE,US,LIEBERT, volume 4, No. 1, 21 March 1998 (21.03.98) pages 1-9-9, XP002112153 ISSN: 1076-6294, abstract; tables 1,4 page 8, paragraph 2	1-4,9,10
A	--- TRIAS AND GORDON: "INNOVATIVE APPROACHES TO NOVEL ANTIBACTERIAL DRUG DISCOVERY" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY,GB,LONDON, volume 8, No.8, 1997, pages 757-762-762, XP002119418, ISSN 0958-1669 page 758, column 1, paragraph 3- column 2, paragraph 1 page 759, column 1, paragraph 2-page 760, column 1, paragraph 1	1-4,9,10
A	--- BLATTNER F R ET AL: "THE COMPLETE GENOME SEQUENCE OF ESCHERICHIA COLI K-12" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, volume 277, 5 September 1997 (05.09.97) pages 1453-1462, XP002069950 ISSN: 0036-8075, cited in the application the whole document	1-4,9,10
A	--- FLEISCHMANN R D ET AL: "WHOLE-GENOME RANDOM SEQUENCING AND ASSEMBLY OF HAEMOPHILUS INFLUENZAE RD" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, volume 269, No. 5223 28 July 1995 (28.07.95), pages 496-498, 507-51, XP000517090 ISSN: 0036-8075, the whole document	1-4,9,10
A	--- TATUSOV R L ET AL: "METABOLISM AND EVOLUTION OF HAEMOPHILUS INFLUENZAE DEDUCED FROM A WHOLE-GENOME COMPARISON WITH ESCHERICHIA COLI" CURRENT BIOLOGY,GB,CURRENT SCIENCE,, volume 6, No. 3, 1 March 1996 (01.03.96) pages 279-291-291, XP000857871 ISSN: 0960-9822, the whole document ---	1-4,9,10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/02713

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	WO 99 54474 A (ARIGONI FABRIZIO ; PEITSCH MANUEL C (CH); LOFERER HANNES (DE); GLAX) 28 October 1999 (28.10.99) the whole document	1-4,9,10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP/00/02713

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 5-8  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
see supplemental sheet INFORMATION FOLLOW-UP PCT/ISA/210
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-10 (partly)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continued from field I.2

Claim nos.: 5-8

Patent claim nos. 5-8 relate to compounds that are each characterised by a desirable property or characteristic, namely "compounds that bind to the proteins described in claim nos. 1 and 2." The patent claims therefore cover all of the compounds having this property or characteristic, while the patent application does not support any such compounds accordingly in the description, within the meaning of PCT Article 5. In this case, the patent claims lack the appropriate support or the patent application lacks the necessary disclosure to the extent that a meaningful search covering the entire scope of protection sought seems impossible. Notwithstanding this, the patent claims also lack the clarity required in PCT Article 6 insofar as they attempt to define the compounds by the desired result, respectively. This lack of clarity is also such that it renders a meaningful search covering the entire scope of protection sought impossible. The search therefore focussed on those parts of the patent claims that appear to be clear, supported or disclosed within the above meaning, i.e. the claimed uses of the proteins described in claim nos.: 1-4 and the corresponding methods according to claim nos. 9 and 10.

The applicant is advised that patent claims or parts of patent claims relating to inventions for which no international search has been produced cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). As a general rule, the EPO in its capacity as the authority entrusted with the task of carrying out an international preliminary examination will not conduct a preliminary examination for subjects in respect of which no search has been provided. This also applies to cases where the patent claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or to cases where the applicant presents new patent claims in the course of the PCT Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP00/02713

1. Claim nos.: 1-10 (in part)

Method for identifying antibacterial compounds using YqgF

2. Claim nos.: 1-10 (in part)

Method for identifying antibacterial compounds using Yhbc

3. Claim nos.: 1-10 (in part)

Method for identifying antibacterial compounds using YggJ

4. Claim nos.: 1-10 (in part)

Method for identifying antibacterial compounds using Ygbp or YgbB

5. Claim nos.: 1-10 (in part)

Method for identifying antibacterial compounds using YchB

6. Claim nos.: 1-10 (in part)

Method for identifying antibacterial compounds using YjeE

7. Claim nos.: 1-10 (in part)

Method for identifying antibacterial compounds using KdtB

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP00/02713

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9842875 A	01-10-1998	US 5858367 A AU 6589098 A EP 0975801 A	12-01-1999 20-10-1998 02-02-2000
WO 9954474 A	28-10-1999	AU 3709099 A	08-11-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT, LP 00/02713

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 7 C12Q1/18 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 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)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 98 42875 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 1. Oktober 1998 (1998-10-01) Seite 21, Zeile 28 -Seite 22, Zeile 13 Seite 27, Zeile 6 -Seite 30, Zeile 21 Ansprüche 7-11; Abbildung 4; Beispiele 2,4	1-4,9,10
A	ARIGONI F ET AL: "A genome-based approach for the identification of essential bacterial genes" NATURE BIOTECHNOLOGY,US,NATURE PUBLISHING, Bd. 16, Nr. 16, September 1998 (1998-09), Seiten 851-856-856, XP002124132 ISSN: 1087-0156 in der Anmeldung erwähnt Seite 855, Spalte 1, Absatz 4 -Spalte 2, Absatz 1; Tabelle 2	1-4,9,10
	---	
	-/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>o</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

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

- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Juni 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15. 09. 2000

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

Gundlach, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie <sup>2</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BALTZ ET AL: "DNA sequence sampling of the Streptococcus pneumoniae genome to identify novel targets for antibiotic development"</p> <p>MICROBIAL DRUG RESISTANCE,US,LIEBERT, Bd. 4, Nr. 1, 21. März 1998 (1998-03-21), Seiten 1-9-9, XP002112153 ISSN: 1076-6294 Zusammenfassung; Tabellen 1,4 Seite 8, Absatz 2</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4,9,10
A	<p>TRIAS AND GORDON: "INNOVATIVE APPROACHES TO NOVEL ANTIBACTERIAL DRUG DISCOVERY" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY,GB,LONDON, Bd. 8, Nr. 8, 1997, Seiten 757-762-762, XP002119418 ISSN: 0958-1669 Seite 758, Spalte 1, Absatz 3 -Spalte 2, Absatz 1 Seite 759, Spalte 1, Absatz 2 -Seite 760, Spalte 1, Absatz 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4,9,10
A	<p>BLATTNER F R ET AL: "THE COMPLETE GENOME SEQUENCE OF ESCHERICHIA COLI K-12" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, Bd. 277, 5. September 1997 (1997-09-05), Seiten 1453-1462, XP002069950 ISSN: 0036-8075 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4,9,10
A	<p>FLEISCHMANN R D ET AL: "WHOLE-GENOME RANDOM SEQUENCING AND ASSEMBLY OF HAEMOPHILUS INFLUENZAE RD" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, Bd. 269, Nr. 5223, 28. Juli 1995 (1995-07-28), Seiten 496-498,507-51, XP000517090 ISSN: 0036-8075 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4,9,10
A	<p>TATUSOV R L ET AL: "METABOLISM AND EVOLUTION OF HAEMOPHILUS INFLUENZAE DEDUCED FROM A WHOLE-GENOME COMPARISON WITH ESCHERICHIA COLI" CURRENT BIOLOGY,GB,CURRENT SCIENCE,, Bd. 6, Nr. 3, 1. März 1996 (1996-03-01), Seiten 279-291-291, XP000857871 ISSN: 0960-9822 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-4,9,10
	-/--	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT, LP 00/02713

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	WO 99 54474 A (ARIGONI FABRIZIO ;PEITSCH MANUEL C (CH); LOFERER HANNES (DE); GLAX) 28. Oktober 1999 (1999-10-28) das ganze Dokument -----	1-4,9,10

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 00/02713

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

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

1.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2.  Ansprüche Nr. 5-8  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
  
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

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

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

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
1-10 (teilweise)

## Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 5-8

Die geltenden Patentansprüche 5-8 beziehen sich auf Verbindungen, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich "Verbindungen, die an die Proteine gemäss Anspruch 1 und 2 binden".

Die Patentansprüche umfassen daher alle Verbindungen, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT für keine solche Verbindungen liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Verbindungen über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die beanspruchten Verwendungen der Proteine gemäss Anspruch 1-4 und die entsprechenden Verfahren gemäss Ansprüchen 9 und 10.

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

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## 1. Ansprüche: 1-10 (teilweise)

Verfahren zur Identifizierung von antibakteriellen Verbindungen unter Verwendung von YqgF

## 2. Ansprüche: 1-10 (teilweise)

Verfahren zur Identifizierung von antibakteriellen Verbindungen unter Verwendung von YhbC

## 3. Ansprüche: 1-10 (teilweise)

Verfahren zur Identifizierung von antibakteriellen Verbindungen unter Verwendung von YggJ

## 4. Ansprüche: 1-10 (teilweise)

Verfahren zur Identifizierung von antibakteriellen Verbindungen unter Verwendung von YgbP oder YgbB

## 5. Ansprüche: 1-10 (teilweise)

Verfahren zur Identifizierung von antibakteriellen Verbindungen unter Verwendung von YchB

## 6. Ansprüche: 1-10 (teilweise)

Verfahren zur Identifizierung von antibakteriellen Verbindungen unter Verwendung von YjeE

## 7. Ansprüche: 1-10 (teilweise)

Verfahren zur Identifizierung von antibakteriellen Verbindungen unter Verwendung von KdtB

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichung: alle zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen  
 PCI, EP 00/02713

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9842875 A	01-10-1998	US 5858367 A	12-01-1999
		AU 6589098 A	20-10-1998
		EP 0975801 A	02-02-2000
-----			
WO 9954474 A	28-10-1999	AU 3709099 A	08-11-1999
-----			