

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG
(19) Weltorganisation für geistiges

Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
28. Juni 2012 (28.06.2012)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/083329 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 9/10 (2006.01) C12N 15/80 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01) C12P 19/26 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT2011/000510

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. Dezember 2011 (22.12.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
A 2111/2010 22. Dezember 2010 (22.12.2010) AT

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN [AT/AT]; Karlsplatz 13, A-1040 Wien (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MACH-AIGNER, Astrid [AT/AT]; Hauptstrasse 22, A-3011 Untertullnerbach (AT). MACH, Robert [AT/AT]; Hauptstrasse 22, A-3011 Untertullnerbach (AT). STEIGER, Matthias, G. [AT/AT]; Gentzgasse 150/4/13, A-1180 Wien (AT).

(74) Anwalt: SONN & PARTNER PATENTANWÄLTE; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,

BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

(54) Title: METHOD AND AGENTS FOR PRODUCING N-ACETYLNEURAMINIC ACID (NEUNAC)

(54) Bezeichnung : VERFAHREN UND MITTEL ZUR HERSTELLUNG VON N-ACETYLNEURAMINSÄURE (NEUNAC)

(57) Abstract: The invention relates to an isolated nucleic acid molecule comprising at least one promoter that is active in fungal cells of the trichoderma species, wherein a nucleic acid sequence encoding an N-acetylglucosamine-2-epimerase and/or an N-acetylneuraminic acid synthase is operatively bound to each promoter. The at least one promoter that is active in fungal cells is a constitutive promoter.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein isoliertes Nukleinsäuremolekül umfassend mindestens einen in Pilzzellen der Gattung Trichoderma aktiven Promoter an dem jeweils eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine N-Acetylglucosamin-2-Epimerase und/oder eine N-Acetylneuraminsäure-Synthase operativ gebunden ist, wobei der mindestens eine in Pilzzellen aktive Promoter ein konstitutiver Promoter ist.



WO 2012/083329 A1

Verfahren und Mittel zur Herstellung von N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc)

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zur Herstellung von N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc).

N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc) gehört zu den Sialinsäuren. In Säugetieren werden Sialinsäuren üblicherweise als terminaler Rest von Zucker-Konjugaten an der Zelloberfläche gefunden. Aufgrund ihrer endständigen Position und der negativen Carboxylierungsfunktion spielen Sialinsäuren eine wichtige Rolle bei der zellulären Erkennung und bei Adhäsionsprozessen.

Derivate von NeuNAc werden als Neuraminidase-Inhibitoren zur Behandlung von viralen Infektionen, wie Influenza, eingesetzt. NeuNAc dient dabei als ein Edukt für die Herstellung derartiger Medikamente, wie z.B. Oseltamivir und Zanamivir. NeuNAc kann aus entsprechenden Rohstoffen, wie Milch und Eiern, extrahiert oder auch chemisch synthetisiert werden. Derzeit wird NeuNAc ausschließlich aus Rohstoffen wie N-Acetylglucosamin hergestellt, wobei ein Teil der bekannten Verfahren enzymatisch katalysierte Schritte umfasst.

In EP 1 154 018 A1 wird eine N-Acetylglucosamin 2-Epimerase mit einer spezifischen Aminosäuresequenz beschrieben. Gemäß dieser europäischen Patentanmeldung kann diese Epimerase rekombinant in verschiedensten Wirtszellen, unter anderem in Hefen, hergestellt werden. Dabei können Expressionsvektoren verwendet werden, die einen Promoter aufweisen, der funktionell an ein für N-Acetylglucosamin 2-Epimerase kodierendes Nukleinsäuremolekül gebunden ist.

In der EP 1 484 406 A1 wird ein Verfahren zur Herstellung von N-Acetylneuraminsäure beschrieben. Dabei werden verschiedenste induzierbare Promotoren erwähnt, die in der Lage sind, die Expression der Enzyme, die bei der Herstellung von N-Acetylneuraminsäure benötigt werden, zu kontrollieren.

In der WO 94/29476 wird ein Verfahren zur Herstellung von NeuNAc beschrieben, bei dem zunächst N-Acetyl-D-Glucosamin zu N-Acetyl-D-Mannosamin durch Epimerisierung umgewandelt wird. Das Produkt dieses ersten Schritts wird anschließend mit Pyruvat und einer NeuNAc-Aldolase zu NeuNAc umgesetzt.

In der US 7,579,175 und der EP 1 081 230 A2 wird ein Verfahren zur Herstellung von NeuNAc beschrieben, bei dem Mikroorga-

nismen mit einer NeuNAC Synthetase-Aktivität und Bakterien, wie beispielsweise E. coli, die in der Lage sind Phosphophenolbenztraubensäure zu synthetisieren, in einem Medium kultiviert werden, in dem sich N-Acetylmannosamin und Glukose oder Fruktose befindet.

Alternativ zu den zuvor genannten Verfahren wird in der EP 0 578 825 ein Verfahren zur Herstellung von NeuNAC geoffenbart, bei dem N-Acetylglukosamin und Benztraubensäure mit N-Acetylneuraminsäure-Lyase umgesetzt wird.

Der Nachteil der zuvor beschriebenen Verfahren liegt darin, dass es sich zumeist um Gleichgewichtsreaktionen handelt, bei denen ein Überschuss an Pyruvat eingesetzt werden muss, um die Gleichgewichtsreaktion zur NeuNAC zu verschieben. Des Weiteren ist das in diesen Reaktionen verwendete N-Acetylglukosamin zu teuer, um kostengünstig NeuNAC herzustellen. Es ist somit Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, welches die zuvor genannten Nachteile nicht aufweist.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein isoliertes Nukleinsäuremolekül umfassend mindestens einen in Pilzzellen der Gattung Trichoderma aktiven Promoter, an dem jeweils eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine N-Acetylglukosamin-2-Epimerase und/oder eine N-Acetylneuraminsäure-Synthase operativ gebunden ist, wobei der mindestens eine in Pilzzellen aktive Promoter ein konstitutiver Promoter ist.

Es hat sich erfindungsgemäß herausgestellt, dass NeuNAC in einfacher und effizienter Weise in einer Pilzzelle der Gattung Trichoderma hergestellt werden kann, wenn diese Pilzzelle in der Lage ist N-Acetylglukosamin-2-Epimerase und N-Acetylneuraminsäure-Synthase konstitutiv zu exprimieren. Die dabei eingesetzte Pilzzelle sollte auch in der Lage sein, ausreichend N-Acetyl-D-Glukosamin bereit zu stellen, um daraus mithilfe der N-Acetylglukosamin-2-Epimerase N-Acetyl-D-Mannosamin herzustellen, welches schließlich mithilfe der N-Acetylneuraminsäure-Synthase NeuNAC synthetisiert. Selbstverständlich wäre es auch möglich, Pilzzellen zu verwenden, die nicht in der Lage sind N-Acetyl-D-Glukosamin bereitzustellen. In einem derartigen Fall müsste N-Acetyl-D-Glukosamin dem Kultivierungsmedium zugesetzt werden oder es werden Organismen verwendet, die in der Lage sind N-Acetyl-D-Glukosamin an das Medium abzugeben.

Da natürlich vorkommende Pilzzellen nicht in der Lage sind N-Acetylglukosamin-2-Epimerase und N-Acetylneuraminsäure-Synthase zu exprimieren müssen in die verwendeten Pilzzellen entsprechende Nukleinsäuremoleküle eingebracht werden, welche die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen umfassen. Das einzubringende Nukleinsäuremolekül kann dabei die Nukleinsäuresequenzen beider Enzyme umfassen. Alternativ dazu können auch zwei Nukleinsäuremoleküle in die Pilzzelle eingebracht werden, wobei ein Molekül für die N-Acetylglukosamin-2-Epimerase und ein Molekül für die N-Acetylneuraminsäure-Synthase kodiert. Beide Moleküle müssen jedoch konstitutiv in der Wirtszelle exprimiert werden.

Um eine konstitutive Expression der beiden Enzyme zu ermöglichen, sind deren kodierenden Nukleinsäuresequenzen operativ an einen in Pilzzellen konstitutiv wirkenden Promoter gebunden.

Erfindungsgemäß bedeutet „operativ daran gebunden“, dass die Nukleotidsequenz kodierend für die erfindungsgemäßen Enzyme derart an die Regulationssequenz(en) gebunden ist, dass die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist und die beiden Sequenzen derart aneinander gebunden sind, dass sie die vorhergesagte, der Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen. Eine Nukleinsäure ist „operativ gebunden“, wenn sie in eine funktionelle Beziehung mit einer anderen Nukleinsäuresequenz gebracht wird. Ein Promotor ist somit operativ an eine kodierende Sequenz gebunden, wenn er die Transkription der Sequenz beeinflusst. Das Binden wird durch Ligation an zweckdienlichen Restriktionsstellen erzielt. Wenn solche Stellen nicht vorliegen, werden synthetische Oligonukleotidadaptern gemäß herkömmlicher Praxis verwendet.

Ein „konstitutiver Promoter“ ist ein Promotor, der es einem Gen oder Operon ermöglicht, kontinuierlich in einer Zelle exprimiert zu werden. Ein „konstitutiver Promoter“ ist in den meisten Phasen des Wachstums transkriptionell aktiv. Im Gegensatz dazu kann die Expressionsrate von Genen oder Operons, welche operativ an „induzierbare Promotoren“ gebunden sind, gezielt geregelt werden, so dass unter bestimmten Bedingungen die Transkription gänzlich herunterreguliert wird und unter anderen, vorzugsweise extrinsischen, Bedingungen hochreguliert wird.

N-Acetyl-D-Glukosamin-2-Epimerase bzw. N-Acetylglukosamin-2-Epimerase (EC 5.1.3.8) katalysiert die Reaktion von N-Acetylglukosamin zu N-Acetylmannosamin. Die kodierende Nuklein-

säuresequenz dieses Enzyms ist u.a. von Säugetieren und Bakterien, wie Cyanobakterien, beschrieben, in denen diese Enzyme exprimiert werden. Die entsprechenden kodierenden Nukleinsäuresequenzen dieser Enzyme können erfindungsgemäß eingesetzt werden. Um die Expression in Pilzzellen zu verbessern, ist es möglich aus einer Aminosäuresequenz der Epimerase kodon-optimierte Nukleinsäuresequenzen zu erzeugen, die schließlich im erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül eingesetzt werden. Es ist besonders bevorzugt die N-Acetylglukosamin-2-Epimerase aus *Anabaena* sp. (GenBank ABG57042) im erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül vorzusehen und in Pilzzellen zu exprimieren.

Um die Expression der zuvor genannten Enzyme zu verbessern, ist es von Vorteil die Nukleinsäuresequenzen bezüglich deren Kodonhäufigkeit in einer Wirtszelle, in der diese eingebracht werden, zu optimieren. Die Kodon-Optimierung wurde anhand der Information über die Häufigkeit der Kodons, z.B., in *Trichoderma reesei* durchgeführt. Diese Information kann aus der „Codon Usage Database“ abgerufen werden und die Kodonverwendung von *Trichoderma reesei* ist in Tabelle 1 angeführt.

Tabelle 1: Kodonverwendung bei *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*), z.B. basierend auf der Analyse von 118 CDS's (54050 codons) (Quelle: <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=51453>)

Felder: [Triplet] [Vorkommenshäufigkeit per 1000] ([Anzahl])

UUU 13.3(719)	UCU 10.7(580)	UAU 8.6(463)	UGU 3.0(164)
UUC 24.3(1311)	UCC 20.4(1101)	UAC 27.5(1486)	UGC 10.6(575)
UUA 0.7(39)	UCA 6.4(345)	UAA 0.9(50)	UGA 0.5(29)
UUG 7.9(428)	UCG 16.0(866)	UAG 0.7(39)	UGG 16.7(904)
CUU 9.4(510)	CCU 12.3(663)	CAU 5.3(285)	CGU 5.5(295)
CUC 29.9(1617)	CCC 25.4(1375)	CAC 17.7(957)	CGC 17.4(939)
CUA 2.3(125)	CCA 6.9(371)	CAA 8.7(469)	CGA 7.3(394)
CUG 27.3(1473)	CCG 11.9(641)	CAG 31.9(1725)	CGG 5.6(300)
AUU 16.0(866)	ACU 10.7(578)	AAU 8.3(447)	AGU 3.9(213)
AUC 31.0(1676)	ACC 27.2(1470)	AAC 38.4(2077)	AGC 22.2(1202)
AUA 2.1(115)	ACA 7.5(405)	AAA 4.6(250)	AGA 2.9(158)
AUG 20.1(1085)	ACG 18.3(987)	AAG 42.4(2293)	AGG 5.2(279)
GUU 11.2(608)	GCU 18.0(972)	GAU 15.8(854)	GGU 14.0(754)
GUC 36.9(1992)	GCC 48.0(2596)	GAC 41.0(2214)	GGC 51.0(2758)
GUA 2.4(131)	GCA 10.5(566)	GAA 10.2(551)	GGA 13.3(720)
GUG 14.8(800)	GCG 14.2(765)	GAG 38.0(2052)	GGG 7.0(378)

N-Acetylneuraminsäure-Synthase (EC 2.5.1.56) katalysiert die

Reaktion von N-Acetylmannosamin zu NeuNAc. Bei dieser Reaktion wird zudem Phosphoenolpyruvat und Wasser als Co-Substrat umgesetzt. N-Acetylneuraminsäure-Synthase wird in Bakterien, wie *E. coli*, *Campylobacter jejuni* und *Neisseria meningitidis*, exprimiert. Die entsprechenden Nuklein- und Aminosäuresequenzen sind somit hinreichend bekannt bzw. identifizierbar. Aus den bekannten Sequenzen ist es möglich Kodon-optimierte Nukleinsäuresequenzen abzuleiten, die besonders gut in Pilzzellen transkribiert bzw. translatiert werden. Es ist besonders bevorzugt N-Acetylneuraminsäure-Synthase aus *Campylobacter jejuni* (e.g. *C. jejuni* NCTC11168) im erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül vorzusehen und in Pilzzellen zu exprimieren.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die N-Acetyl-D-Glukosamin-2-Epimerase durch die folgende Nukleinsäuresequenz kodiert:

**atgggcaagaacctccaggccctggcccagctctacaagaacgccctcctca-
acgacgtcctgccccttctgggagaaccacagcctcgacagcgagggcggtacttcac-
ctgcctcgaccgccagggcaaggtctacgacaccgacaagttcatctggctccagaac-
cgccaggtctggaccttcagcatgctctgcaaccagctggagaagcgcgagaactggctcaa-
gatcgcccgcaacggcgccaagttcctcgcccagcacggccgacgacgagggcaactgg-
tactttgcctgacctcgggcgggcagcctctgggtccagccctacaacatcttca-
gcgactgcttcgcccgatggccttcagccagtagccctcgccagcggcgag-
gagtgggccaaggacgtcgccatgcaggcctacaacaacgtcctccgcccgaaggacaac-
ccaagggcaagtacaccaagacctaccccgccacccgccccat-
gaaggccctggctgtccccatgatcctcgccaacctcaccctggagatg-
gagtggctcctccccaggagaccctggagaacgtcctcgccgccaccgtccaggaggtcat-
gggcgacttctcgaccaggagcagggcctcatg-
tacgagaacgtcgccccgacggcagccacatcgactgcttcgagggccgcctcatcaac-
cccggccacggcatcgaggccatgtggttcatcatg-
gacatcgcccggcgaagaacgacagcaagaccatcaaccaggccgtcgacgtcgtcctca-
acatcctcaacttcgcctgggacaacgagtagcggcggcctctactacttcatg-
gacgccggccggccacccccccagcagctggagtgaggaccagaagctctgggtgggtccacctg-
gagagcctcgtcgcccctcgccatgggctaccgcctcaccggccgacgacctgctgggacctgg-
tatcagaagatgcacgactacagctggcagcacttcgcccaccctgagtacggcgagtggtt-
cggctacctcaaccgcccagggcgaggtcctcctcaacctcaagggcggaagtg-
gaagggctgcttccacgtcccccgccatgtacctctgctggcagcagttcgagggcctca-
gctaa**

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorlie-

genden Erfindung wird die N-Acetylneuraminsäure-Synthase durch die folgende Nukleinsäuresequenz kodiert:

atgcagatcaagatcgacaagctcaccatcagccagaagaaccccctcatcatccccga-
gatcggcatcaaccacaacggcagcctggagatcgccaagctcat-
ggtcgacgccgccaagcgagccggcgccaagatcatcaagcaccagaccacatcgtcgag-
gacgagatgagccaggaggccaagaacgtcatccccggcaacgccaacatcagcatctacga-
gatcatggagcagtgcgccctcaactacaaggacgagctggccctcaaggag-
tacgtcgagaagcagggcctcgtctacctcagcacccttcagccgcgccgcccgccaac-
cgctggaggacatgggcgtcagcgccctacaagatcggcagcggcgagtgcaacaactac-
ccctgatcaagcacatcgcccagttcaagaagccatgatcatcagcaccggcat-
gaacagcatcgagagcatcaagcccacgtcaagatcctccgcgactacgagatcccctt-
cgtcctcctgcacaccaccaacctctaccccacccccagccac-
ctcgtccgcctccaggccatgctggagctgtacaaggagttcaactgcctctacggcctca-
gcgaccacacgacgaacaacctcgccctgcatcggcgccatcgccctcggcgccagcgtcctg-
gagcgccacttcaccgacaccatggaccgcaagggccccgacatcgtctgcagcatg-
gacgagagcaccctcaaggacctcatcaaccagaccaggagat-
ggtcctcctccgcgggcgacaacaacaagaaccccctgaaggaggagcaggtcacca-
tcgacttcgccttcgccagcgtcgtcagcatcaaggacatcaagaagggcgagatcctca-
gcatggacaacatctgggtcaagcgccccagcaagggcgccatcagcgccaaggactt-
cgaggccatcctcggcaagcgcgccaagaaggacatcaagaacaacatccagctcacctgg-
gacgacttcgag**taa**

Die erfindungsgemäßen Pilzzellen gehören der Gattung Trichoderma an.

Pilzzellen der Gattung Trichoderma eignen sich besonders gut zur Biosynthese von NeuNAc, da die Mitglieder dieser Gattung in der Lage sind ausreichend N-Acetyl-D-Glukosamin zur Verfügung zu stellen.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die Pilzzellen Trichoderma reesei Zellen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der konstitutive Promoter ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Promotoren der Glykolysegene, insbesondere pki, gpd oder zwf1, tef1a, act, cox4, neg1 und sar1.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß der vorliegenden Erfindung.

Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft

eine Pilzzelle der Gattung Trichoderma umfassend ein Nukleinsäuremolekül oder einen Vektor gemäß der vorliegenden Erfindung.

In die erfindungsgemäße Pilzzelle können ein oder mehrere Nukleinsäuremoleküle bzw. Vektoren umfassend Nukleinsäuresequenzen kodierend für N-Acetylglucosamin-2-Epimerase und N-Acetylneuraminsäure-Synthase eingebracht werden. Die für die Enzyme kodierenden Abschnitte sind operativ an einen konstitutiven Promotor gebunden.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül bzw. der erfindungsgemäße Vektor werden in die Wirtszelle mit allgemein bekannten Verfahren eingebracht.

Die erfindungsgemäße Pilzzelle gehört der Gattung Trichoderma an. Mitglieder der Gattung Trichoderma sind in der Lage durch Abbau von Chitin N-Acetylglucosamin in einer ausreichenden Menge bereit zu stellen, um hinreichend NeuNAC unter Zuhilfenahme von rekombinant exprimierter N-Acetylglucosamin-2-Epimerase und N-Acetylneuraminsäure-Synthase zu synthetisieren. Daher werden erfindungsgemäß Pilzzellen dieser Gattung besonders bevorzugt eingesetzt.

Wird als Ausgangssubstanz Chitin verwendet, wird dieses in N-Acetyl Glucosamin abgebaut. Dieses Monomer kann sowohl als Kohlenstoff als auch als Stickstoffquelle für das Zellwachstum, sowie als Baustein für die Zellwandbiosynthese (ein wesentlicher Bestandteil ist Chitin) als auch für die Synthese von N-Acetyl Neuraminsäure verwendet werden. Ein induzierbares System setzt punktuell ein und überlastet somit die Verfügbarkeit von N-Acetyl Glucosamin. Im Gegensatz dazu wird durch ein konstitutives System kontinuierlich N-Acetyl Glucosamin abgezogen und somit eine kontinuierliche Produktbildung ermöglicht.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Pilzzelle Trichoderma reesei.

Die erfindungsgemäße Pilzzelle umfasst mindestens ein Nukleinsäuremolekül, dessen Nukleinsäuresequenz für eine N-Acetylglucosamin-2-Epimerase und eine N-Acetylneuraminase-Synthase kodiert und operativ an einen in Pilzzellen aktiven konstitutiven Promoter gebunden ist.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von N-Acetylneuraminsäure (NeuNAC) umfassend das Kultivieren von Pilzzellen gemäß der vorliegenden Erfindung in Anwesenheit einer N-Acetyl-D-Glucosamin-Quelle.

Um NeuNAc mit einer N-Acetylglukosamin-2-Epimerase und einer N-Acetylneuraminsäure-Synthase herzustellen, wird N-Acetyl-D-Glukosamin als Substrat benötigt. Daher ist es notwendig Pilzzellen zu verwenden, die in der Lage sind dieses Substrat zur Verfügung zu stellen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die N-Acetyl-D-glukosamin-Quelle Chitin.

Die gegenständliche Erfindung wird anhand der folgenden Figuren und Beispiele eingehender illustriert, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein.

Fig. 1 gibt einen Überblick über die möglichen metabolischen Reaktionswege ausgehend vom Polymer Chitin bis zur Bildung von NeuNAc. Metabolische Zwischenprodukte sind in Rechtecken dargestellt und Pfeile symbolisieren enzymkatalysierte Reaktionen. Neben dem Pfeil ist die korrespondierende EC Nummer der Enzymreaktion angeführt. Ein eingekreistes Plus bezeichnet eine Enzymreaktion, die im Genom von *Trichoderma reesei* einem Gen zugewiesen werden konnte (<http://genome.jgipsf.org/Trire2/Trire2.home.html>). Im Falle von eingekreisten Minus kann kein annotiertes Gen im derzeit publizierten Genom gefunden werden.

Fig. 2 zeigt die Bildung von NeuNAc in einer in vitro Reaktion mit heterolog expremierten T. reesei Protein im transgenen Stamm PEC/PSC1 unter Verwendung der Substrate GlcNAc, ATP und PEP.

(a) Die extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) einer HPLC-MS-Analyse bei einer Masse von 222.098 atomaren Masseneinheiten (amu) sind dargestellt. Diese Masse korrespondiert mit der Masse des [GlcNAc+H]⁺ Ions sowie mit der des [ManNAc +H]⁺ Ions. Die Retentionszeit (RZ) von GlcNAc (12,988 min) sowie ManNAc (12.288) wurden mit reinen Standards beider Substanzen bestimmt und diese ist mit einer vertikalen Linie im Chromatogramm eingezeichnet. (1) Chromatogramm der in vitro Enzymreaktion mit GST-Fusionsproteinen von GlcNAc-2-epimerase und NeuNAc-Synthase, welche in *E. coli* expremiert wurden. (2) Chromatogramm der Enzymreaktion mit dem zellfreien Extrakt des transgenen PEC/PSC1 Stammes. (3) Chromatogramm der Reaktion mit dem zellfreien Extrakt des Ausgangsstammes QM9414 als Negativkontrolle.

(b) Die EICs bei einer Masse von 310.1134 amu werden gezeigt, welche mit der Masse des [NeuNAc+H]⁺ Ions übereinstimmt

und bei einer Retentionszeit von 8.345 min detektiert werden kann. Im Falle von Chromatogramm (1), (2) bzw. (3) handelt es sich um dieselben Proben wie unter Punkt (a) geschildert, wobei Chromatogramm (2) gegenüber Chromatogramm (1) um das 10-fache und Chromatogramm (3) um das 1000-fache verstärkt wurden. (ad 1) Beinhaltet das Massenspektrum zu Chromatogramm (1) bei der Retentionszeit von 8.345 min. (ad 2) Zeigt das Massenspektrum von Chromatogramm (2) bei der Retentionszeit von 8.348 min.

Fig. 3 zeigt die Bildung von NeuNac in vivo in *T. reesei* im transgenen Stamm PEC/PSC1 nach Kultivierung auf GlcNac für 66 h.

(a) Die EICs der HPLC-MS-Analyse bei einer Masse von 222.097 amu werden gezeigt ([GlcNac+H]⁺ Ion sowie [ManNac +H]⁺ Ion). Die Retentionszeit (RZ) von GlcNac (12,988 min) sowie ManNac (12.288) wurden mit reinen Standards beider Substanzen bestimmt und diese ist mit einer vertikalen Linie im Chromatogramm eingezeichnet. (1) Chromatogramm der in vitro Enzymreaktion mit GST Fusionsproteinen von GlcNac-2-epimerase und NeuNac Synthase, welche in *E. coli* expremiert wurden. (2) Chromatogramm des zellfreien Extraktes des transgenen PEC/PSC1 Stammes. (3) Chromatogramm des zellfreien Extraktes des Ausgangsstammes QM9414 als Negativkontrolle.

(b) Die EICs bei einer Masse von 310.1134 amu werden gezeigt, welche mit der Masse des [NeuNac+H]⁺ Ions korrespondiert und bei einer Retentionszeit von 8.345 min detektiert werden kann. Im Falle von Chromatogramm (1), (2) bzw. (3) handelt es sich um dieselben Proben wie unter Punkt (a) geschildert, wobei Chromatogramm (2) gegenüber Chromatogramm (1) um das 100 fache und Chromatogramm (3) um das 1000 fache verstärkt wurden. (ad 1) Beinhaltet das Massenspektrum zu Chromatogramm (1) bei der Retentionszeit von 8.345 min. (ad 2) Zeigt das Massenspektrum von Chromatogramm (2) bei der Retentionszeit von 8.348 min.

BEISPIEL:

Materialien und Methoden

Stämme und Kultivierungsbedingungen

Trichoderma reesei (*Hypocrea jecorina*) QM9414 (ATCC 26921) wurde als Ausgangsstamm in diesem Beispiel verwendet und wurde auf Malzextraktagar kultiviert.

Myzelien für die in vitro Enzymreaktionen wurden aus Kultivierungen der Stämme in 1000-mL-Erlenmeyerkolben mit je 200 mL 3% (w/v) Malzextraktmedium gewonnen. Die Flaschen wurden mit

10⁸ Konidien pro Liter inokuliert und die Kultivierung erfolgte bei 30°C und 250 rpm für 40 h. Die Kultivierung von *T. reesei* auf kolloidalem Chitin wurde in 1000-mL-Erlenmeyerkolben mit je 200 mL Mandels-Andreotti Medium beinhalten 1 % (w/v) kolloidales Chitin sowie 0.1 % (w/v) Bacto Pepton durchgeführt. Die Inokulierung erfolgte mit 10⁸ Konidien pro Liter und die Inkubation erfolgte auf 30 °C / 250 rpm für 90 h.

Für die in vivo Herstellung von NeuNAC wurden die entsprechenden *T. reesei* Stämme direkt in 250 mL Mandels-Andreotti Medium mit 1% (w/v) GlcNAc bei 30°C und 250 rpm für 66 h kultiviert (Inokulation mit 10⁸ Sporen/Liter).

Synthetische Gene und Plasmidkonstruktion

Das synthetische Gen *tbage* wurde anhand der Proteinsequenz von *Anabaena* sp. CH1 GlcNAc-2-epimerase (GenBank: ABG57042) generiert indem die Proteinsequenz mit der Software GeneOptimizer® (Geneart, Deutschland) in eine DNA-Sequenz übersetzt wurde. Hierbei wurde die DNA-Sequenz hinsichtlich der Kodonverwendung von *T. reesei* (Tabelle 1) optimiert:

>*tbage*

tctaga**at**gggcaagaacctccaggccctggcccagctctacaagaacgcctcctca-
 acgacgtcctgccccttctgggagaaccacagcctcgacagcgagggcggctacttcac-
 ctgcctcgaccgccagggcaaggtctacgacaccgacaagttcatctggctccagaac-
 cgccaggtctggaccttcagcatgctctgcaaccagctggagaagcgcgagaactggctcaa-
 gatcgcccgcaacggcgccaagttcctcgcccagcacggccgacgacgagggcaactgg-
 tactttgccctgaccgcggcgggcagcctctggtccagccctacaacatcttca-
 gcgactgcttcgcccgcctatggccttcagccagtagccctcgccagcggcgag-
 gaggggccaaggacgtcgccatgcaggcctacaacaacgtcctccgcccgaaggacaac-
 cccaagggaagtagaccaagacctaccccgccaccgccccat-
 gaaggccctggctgtccccatgatcctcgccaacctcaccctggagatg-
 gaggctcctccccaggagaccctggagaacgtcctcgccgccaccgtccaggaggtcat-
 gggcgacttctcgaccaggagcagggcctcatg-
 tacgagaacgtcgccccgacggcagccacatcgactgcttcgagggccgcctcatcaac-
 cccggccacggcatcgaggccatgtggttcatcatg-
 gacatcgcccggcgaagaacgacagcaagaccatcaaccaggccgtcgacgtcgtcctca-
 acatcctcaacttcgcctgggacaacgagtagcggcctctactacttcatg-
 gacgcccggccacccccccagcagctggagtgaggaccagaagctctgggtgggtccacctg-
 gagagcctcgtcgccctcgccatgggctaccgcctcaccggccgacgcctgctgggcctgg-
 tatcagaagatgcagcactacagctggcagcacttcgcccaccctgagtagggcgagtggtt-
 cggctacctcaaccgcccaggcggaggtcctcctcaacctcaaggcgggcaagtg-

gaagggctgcttccacgtcccccgcgccatgtacctctgctggcagcagttcgagggcctca-
gctaatgcat

In analoger Vorgehensweise wurde das synthetische Gen tneub erzeugt, dem die Proteinsequenz der NeuNAc-Synthase von *Campylobacter jejuni* NCTC11168 zugrundeliegt (<http://old.genedb.org/genedb/cjejuni/index.jsp>, Cj1141) und dessen DNA-Sequenz ebenfalls an die Kodonverwendung von *T. reesei* angepasst wurde:

>tneub

tctagaatgcagatcaagatcgacaagctcaccatcagccagaagaacccccctcatca-
tccccgagatcgccatcaaccacaacggcagcctggagatcgccaagctcat-
ggtcgacgccccaagcgagccggcgccaagatcatcaagcaccagaccacatcgctcgag-
gacgagatgagccaggaggccaagaacgtcatccccggcaacgccaacatcagcatctacga-
gatcatggagcagtgcgccctcaactacaaggacgagctggccctcaaggag-
tacgtcgagaagcagggcctcgctctacctcagcacccttcagccgcgccgcccgaac-
cgctggaggacatggggtcagcgcctacaagatcggcagcggcgagtgcaacaactac-
cccctgatcaagcacatcgcccagttcaagaagccatgatcatcagcaccggcat-
gaacagcatcgagagcatcaagcccacgtcaagatcctccgcgactacgagatcccctt-
cgtcctcctgcacaccaccaacctctacccccacccccagccac-
ctcgtccgcctccaggccatgctggagctgtacaaggagttcaactgcctctacggcctca-
gacacacagcagaacaacctcgctgcatcggcgccatcgccctcggcgccagcgtcctg-
gagcgcacttcaccgacaccatggaccgcaagggccccgacatcgtctgcagcatg-
gacgagagcaccctcaaggacctcatcaaccagaccaggagat-
ggtcctcctccgcgggcacaacaagaacccccctgaaggaggagcaggtcacca-
tcgacttcgccttcgccagcgtcgctcagcatcaaggacatcaagaagggcgagatcctca-
gcatggacaacatctgggtcaagcgcgccagcaagggcgccatcagcgcgaaggactt-
cgaggccatcctcggcaagcgcgccaagaaggacatcaagaacaacatccagctcacctgg-
gacgacttcgagtaatgcat

Für die Konstruktion der Plasmide pMS-PEC und pMS-PSC wurden die synthetischen Gene tbage und tneub aus deren Produktionsplasmid mittels XbaI/NsiI-Restriktionsverdau herausgeschnitten und in das Plasmid pRLM_{ex30} (Mach, R. L et al. 1994. *Curr Genet* 25:567-70) eingefügt wobei das hph Gen zwischen der XbaI und NsiI Schnittstelle durch tbage beziehungsweise tneub ersetzt wurde.

Für die Konstruktion von pGEX-epi und pGEX-syn wurde das Plasmid pGEX4T-2 (GE Healthcare, UK) mit EcoRI und XhoI verdaut.

Eine doppelsträngige DNA, bestehend aus den oligomeren Nukleotiden GEXfw und GEXrev (Tabelle 1), wurde in den offenen pGEX4T-2 eingefügt wodurch das Plasmid pGEX-MS entstand und die neuen Schnittstellen XbaI und NsiI generiert wurden. tbage und tneub wurden in pGEX-MS über die Schnittstellen XbaI/NsiI eingebracht woraufhin die Plasmide pGEX-epi sowie pGEX-syn entstanden.

Tabelle 2: Nukleotidsequenzen der verwendeten Oligomere

Name	Sequenz (5'→3')	Verwendung
NANASfw	GTGGTGTGCAGGAGGACGAA	qPCR tneub
NANASrev	CAAGCACATCGCCCAGTTCAAG	qPCR tneub
ManEfw	GCGATCTTGAGCCAGTTCTC	qPCR tbage
ManErev	GCTACTTCACCTGCCTCGAC	qPCR tbage
GEX-MSfw	AATTCCTTCTAGAGATATGCATC	Konstruktion von pGEX-MS
GEX-MSrev	TCGAGATGCATATCTCTAGAAGG	Konstruktion von pGEX-MS
pkifw R	CTGCGACACTCAGAACATGTACGT	qPCR pki cDNA
pkifw D	GCTCTGCTTGGAACCTGATTGA	qPCR pki DNA
pkirev	GGTCTGGTCGTCCTTGATGCT	qPCR pki
sar1fw	TGGATCGTCAACTGGTTCTACGA	qPCR sar1
sar1rev	GCATGTGTAGCAACGTGGTCTTT	qPCR sar1

Protoplastentransformation von *T. reesei*

Die Protoplastentransformation von *T. reesei* wurde wie in einem früheren Artikel (Gruber, F., et al., 1990. Curr Genet. 18, 71-6) erwähnt ausgeführt. Eine Gesamtmenge von 10 µg DNA wurde pro Transformation verwendet. In einer Kotransformation wurde pMS-PEC (4 µg) und pMS-PSC (4 µg) gemeinsam mit dem Plasmid pHylox2 (2 µg), welches eine Hygromycin B Resistenz vermittelt, transformiert. Rekombinante Stämme wurden auf Hygromycin B Resistenz selektiert.

RNA Analyse

RNA Extraktion, reverse Transkription und qPCR wurden wie in einem früheren Artikel beschrieben ausgeführt. Oligomere Nukleotidsequenzen welche als Primer eingesetzt wurden sind in der Tabelle 1 angeführt. Sar1 wurde als Referenzgen für die Normalisierung der RT-qPCR verwendet. Für das Gen tbage wurden in der qPCR die Primer ManEfw und ManErev bei einer optimalen Elongationstemperatur von 64°C und 2 mM MgCl₂ verwendet. Für das Gen tneub wurden in der qPCR die Primer NANAFw und NANAREv bei einer

optimalen Elongationstemperatur von 64°C verwendet. Für das Gen *pki* wurden in der qPCR die Primer *pkifwR* und *pkirev* bei einer optimalen Elongationstemperatur von 64°C verwendet. Die Datenanalyse wurde mit REST 2008 durchgeführt.

DNA Analyse

Genomische DNA wurde aus den Pilzmyzel wie in einem früheren Artikel beschrieben isoliert. Die Hybridisierung und Detektion wurde gemäß den Standardarbeitsvorschriften mit dem DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche, Schweiz) ausgeführt. qPCR von genomischer DNA wurde mit ~50 ng genomischer Templat-DNA durchgeführt. Dieselben Primer wie in der RNA Analyse wurden für die Gene *tbage* und *tneub* verwendet. Als Referenzgen diente *pki*, welches mit den Primern *pkifwD* und *pkirev* bei einer Elongationstemperatur von 64°C amplifiziert wurde.

Gluthation S-Transferase (GST) Fusionsproteine

GST-Fusionsproteine von GlcNAc-2-Epimerase (GST:epi) sowie NeuNAC-Santhase (GST:syn) wurden durch Expression der Plasmide pGEX-epi und pGEX-syn in *E. coli* BL21(DE3) Zellen erzeugt. Die Reinigung der Fusionsproteine wurde mithilfe von GSTrap™FF Säulchen 1 mL Säulenvolumen (GE Healthcare), unter Verwendung des Standardarbeitsprotokolls realisiert.

Enzymreaktion mit zellfreien Extrakten

Geerntetes Myzel wurde in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Puffer zerrieben und sodann in einem 0.1 M Bicine Puffer (pH 8), der Proteaseinhibitoren (2 µM leupeptin, 1 µM pepstatin A, 10 µM PMSF) beinhaltet, resuspendiert (0.3 g Myzelpulver/1 mL Puffer). Die Suspension wurde mit einem Ultraschallstab Sonifier® 250 Cell Disruptor (Branson, US) (Einstellungen: Power 40%, duty cycle 50%, 20 s Aktion, 40 s Pause, 10 Zyklen) weiter aufgeschlossen und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (10 min, 13000 x g, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde in einem für die enzymatische Reaktion herangezogen. Die Enzymreaktion wurde ähnlich ausgeführt wie von Vann et al. beschrieben (Vann, W. F., et al. 1997. *Glycobiology* 7:697-701). Die Reaktion um die Aktivität von GlcNAc-2-Epimerase nachzuweisen beinhaltet 10 mM GlcNAc, 0.2 mM ATP, 100 mM Bicine Puffer (pH 8) und 10-40 µL zellfreien Extrakt in einem Gesamtvolumen von 100 µL. Die Reaktion um die Aktivität von NeuNAC-Synthase nachzuweisen beinhaltet 10 mM ManNAc, 10 mM PEP, 12.5 mM MnCl₂, 100 mM Bicine Puffer (pH 8) und 10-40 µL zellfreien Extrakt in einem Gesamtvolumen

von 100 μ L. Die Kombinationsreaktion um sowohl die Aktivität von GlcNAc-2-Epimerase als auch NeuNAc-Synthase nachzuweisen beinhaltet 10 mM GlcNAc, 10 mM PEP, 12.5 mM MnCl₂, 100 mM Bicine Puffer (pH 8) und 40 μ L zellfreien Extrakt in einem Gesamtvolumen von 100 μ L. Alle Reaktionen wurden für 60 min bei 37 °C inkubiert, durch Erhitzen auf 85 °C für 10 min inaktiviert und dann mittels HPLC analysiert. Als Positivkontrolle wurden je 5 μ L (1 μ g/ μ L) der GST-Fusionsproteine GST:epi und GST:syn in der Enzymreaktion anstelle der zellfreien Extrakte verwendet.

Chitinase Enzymreaktion

Die Freisetzung von GlcNAc aus dem Polymer Chitin wird in dieser Reaktion gemessen. Das Chitin wurde sowohl als Rohchitin aus Krabbenpanzern sowie als kolloidales Chitin in einem 30 mM Phosphatbuffer (pH 4.7) eingesetzt. 5, 10 oder 50 μ L von Kulturüberstand wurden in einem Totalvolumen von 1.5 mL gemessen. Die Reaktion wurde bei 37 °C für 20 h inkubiert und dann durch Erhitzen bei 90°C für 10 min inaktiviert. Die Bildung von GlcNAc wurde auf der HPLC gemessen.

NeuNAc Detektion in zellfreien Extrakten

Geerntetes Myzel von *T. reesei* wurde in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerrieben und in bidestillierten Wasser resuspendiert (0.3 g Myzelpulver / 1 mL Wasser). Die Suspension wurde mit einem Ultraschallstab Sonifier® 250 Cell Disruptor (Branson, US) (Einstellungen: Power 40%, duty cycle 50%, 20 s Aktion, 40 s Pause, 10 Zyklen) weiter aufgeschlossen und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (10 min, 13000 x g, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde durch einen 0.45 μ m Filter filtriert und mittels HPLC-MS analysiert.

HPLC-MS Analyse

Die Bildung von NeuNAc und ManNAc in der Enzymreaktion sowie im zellfreien Extrakt wurde auf einer HPLC-MS (IT-TOF-MS) (Shimadzu, Japan) mit einer Rezex™ RHM Monosaccharide H⁺-Säule (8%, 300 x 7.8 mm) (Phenomenex, USA) gemessen. Die mobile Phase bestand aus Wasser mit 0.1% (v/v) Trifluoressigsäure und der Fluss wurde auf 0.6 mL / min gesetzt. Die Säulentemperatur betrug 80°C und 10 μ L Probe wurde auf die Säule aufgegeben. Die Detektion erfolgte im ESI⁺ Modus und es wurde ein Scanbereich von 60-600 amu abgedeckt.

Ergebnisse

In silico Analyse eines NeuNAc Biosyntheseweges in *T. reesei*

Derzeit gibt es in der aktuellen Literatur keine Hinweise darauf, dass NeuNAC in *Trichoderma reesei* natürlich gebildet werden kann. Daher wurden *in silico* die bekannten metabolischen Reaktionen überprüft, die zur Bildung von NeuNAC führen und ob diese in *T. reesei* vorkommen. Fig. 1 zeigt die derzeit bekannten enzymkatalysierten Prozesse auf, die zur Bildung von NeuNAC führen und das Biopolymer Chitin als Ausgangssubstanz verwenden. In *Trichoderma* finden sich Enzyme, die für die Katabolisierung von Chitin notwendig sind. Der erste Schritt von Chitin zum Monomer GlcNAC wird hierbei von Chitinasen (3.2.1.14) katalysiert. Weiters ist für die Katabolisierung von Chitin die Aktivität einer Hexokinase (EC 2.7.1.1), einer GlcNAC-6-Phosphat Deazetylase (EC 3.5.1.25) und einer Glucosamin-6-Phosphat Deaminase (EC 3.5.99.6) notwendig, damit schlussendlich Fruktose-6-Phosphat in die Glykolyse eintreten kann. Für diese Enzymaktivitäten kann in *T. reesei* zumindest je ein potentiell Enzym im annotierten Genom gefunden werden (Tabelle 3). Zudem können Gene, die für die Biosynthese von Chitin verantwortlich sind gefunden werden, einschließlich einer Phosphoazetylglucosamin Mutase (EC 5.4.2.3), einer UDP-N-GlcNAC Diphosphorylase (EC 2.7.7.23) und mehrerer Chitinsynthasen (EC 2.4.1.16). Es sind aber keine Gene im Genom von *T. reesei* annotiert, die für die Synthese von ManNAC (EC 5.1.3.8 in Bakterien, EC 5.1.3.4 in Säugetieren) noch für die Synthese von NeuNAC (EC 2.5.1.6. in Bakterien, EC 2.7.1.60, EC 2.5.1.57, EC 3.1.3.29 in Säugetieren) verantwortlich sind.

Tabelle 3: Genkandidaten für die metabolischen Umsetzungen von Chitin und GlcNAC, die im Genom von *T. reesei* annotiert sind.

EC Nummer	Name	Protein Identität
EC 3.2.1.14	Chitinase	<u>2735</u> , <u>43873</u> , <u>53949</u> , <u>62645</u> , <u>62704</u> , <u>66041</u> , <u>68347</u> , <u>72339</u> , <u>80833</u> , <u>81598</u> , <u>104401</u> , <u>110317</u> , <u>119859</u> , <u>123354</u> , <u>124043</u>
EC 2.7.1.1	Hexokinase	<u>56129</u> , <u>73665</u> , <u>79677</u>
EC 3.5.1.25	GlcNAc-6-phosphate Deazetylase	<u>79671</u>
EC 3.5.99.6	Glucosamin-6-Phosphat Deaminase	<u>49898</u>
EC 5.4.2.3	Phosphoazetylglucosa- minmutase	<u>80994</u>
EC 2.7.7.23	UDP-N-GlcNAc Diphosphory- lase	<u>79568</u>
EC 2.4.1.16	Chitinsynthase	<u>51492</u> , <u>55341</u> , <u>58188</u> , <u>71563</u> , <u>112271</u> , <u>122172</u>

Ein Gencluster für die katabolische Umsetzung von GlcNAc in *Trichoderma reesei*

Während der in silico Analyse der Abbauwege für GlcNAc, konnten 3 Genkandidaten (estExt_GeneWisePlus.C_140427, estExt_GeneWisePlus.C_140421, estExt_GeneWise1.C_140432) kodierend für eine Hexokinase, eine GlcNAc-6-phosphate Deazetylase und eine Glucosamin-6-phosphate Deaminase gefunden werden, die alle in direkter Nachbarschaft im Genom von *T. reesei* zu finden sind (Lage im Genom auf „scaffold 14“: 714385-729984). Ähnliche Cluster kommen auch in anderen filamentösen Pilzen wie *Neurospora crassa* oder *Aspergillus nidulans* vor, was auf einen konservierten Cluster für die Katabolisierung von GlcNAc hinweist.

Die Hexokinase (Protein ID 79677), die im Genom von *T. reesei* annotiert ist, kann daher weiters als GlcNAc Kinase (EC

2.7.1.59) spezifiziert werden, analog der Annotation und Charakterisierung wie sie in *Candida albicans* zu finden ist (39). Weiters kann das Gen (estExt_GeneWisePlus.C_140419), welches neben der GlcNAc-6-Phosphat Deazetylase (estExt_GeneWisePlus.C_140421) liegt, ebenfalls zu dem Cluster gehören, da ein Homolog dieses Genes in *Neurospora crassa* als β -N-Azetylglukosaminidase (*N. crassa* OR74A (NC10): Supercontig 6: 560844-564980) annotiert ist.

Konstruktion von Expressionsvektoren

Es wurde eine zwei Enzymstrategie für die Produktion von NeuNAc in *Trichoderma* gewählt, wobei der erste Enzymschritt von einer GlcNAc 2-epimerase (EC 5.1.3.8) und der zweite von einer NeuNAc Synthase (EC 2.5.1.99) katalysiert wird. Als Kandidaten wurde die Proteinsequenz von der GlcNAc 2-Epimerase aus *Anabaena* sp. CH1 (GenBank: ABG57042) und für die NeuNAc Synthase die Proteinsequenz aus *Campylobacter jejuni* NCTC11168 (Cj1141) gewählt. Die Proteinsequenzen wurden in DNA Sequenzen mithilfe der Software GeneOptimizer® (Geneart) übersetzt und die Kodonverwendung an die von *T. reesei* (Tabelle 1) angepasst. Die resultierenden synthetischen Gene wurden *tbage* und *tneub* genannt.

Die kodierenden Sequenzen wurden in das Plasmid pRLMex30 eingesetzt, wobei die kodierende Sequenz für das *hph* Gen aus diesem Plasmid ersetzt wurde. Somit standen beiden Gene unter der Kontrolle des konstitutiven *pki* Promotors und des *cbh2* Terminators (Plasmide pMS-PEC mit *tbage* sowie pMS-PSC mit *tneub*).

Um beide Gene auch unter einem induzierbaren System exprimieren zu können, wurde der *pki* Promotor durch den *xyn1* Promotor ersetzt (Plasmide pMS-XEX mit *tbage*, sowie pMS-XSC mit *tneub*).

Tabelle 4: Vergleich eines induzierbaren Promotorsystems (*xyn1*) gegenüber eines konstitutiven Promotorsystems (*pki*) (n.b. nicht bestimmt, + vorhanden, - nicht vorhanden)

Stamm	Promotor	DNA im Genom		Transkriptbildung		Enzymaktivität	
		Epi-merase	Syn-thase	Epi-merase	Syn-thase	Epi-merase	Syn-thase
XEX5	xyn1	+	n.b.	+	n.b.	-	n.b.
XEX11	xyn1	+	n.b.	+	n.b.	-	n.b.
XSC3	xyn1	n.b.	+	n.b.	+	n.b.	-
XSC13	xyn1	n.b.	+	n.b.	+	n.b.	-
PEC11	pki	+	n.b.	+	n.b.	+	n.b.
PEC15	pki	+	n.b.	+	n.b.	+	n.b.
PEC17	pki	+	n.b.	+	n.b.	+	n.b.
PSC15	pki	n.b.	+	n.b.	+	n.b.	+
PSC16	pki	n.b.	+	n.b.	+	n.b.	+
PSC17	pki	n.b.	+	n.b.	+	n.b.	-
XEX/XSC1	xyn1	+	+	+	+	-	-
XEX/XSC5	xyn1	+	+	+	+	-	-
PEC/PSC1	pki	+	+	+	+	+	+
PEC/PSC10	pki	+	+	+	+	+	-

Um *Trichoderma reesei* Stämme zu erzeugen, die die Fähigkeit haben NeuNAc herzustellen, wurde der Ausgangsstamm QM9414 mit verschiedenen Kombinationen der Plasmide pMS-PEC, pMS-PSC, pMS-XEX sowie pMS-XSC und pMS-Hylox2 (beinhaltet den Selektionsmarker *hph* zwischen zwei *loxP* Sequenzen) transformiert. Es wurden die Plasmide beinhaltend die Gene *tbage* und *tneub* sowohl einzeln als auch in Kombination *tneub/tbage* transformiert.

Ausgewählte Transformanten wurden hinsichtlich der Integration der transformierten DNA ins Genom sowie ihrer Transkriptbildung und Enzymaktivität von GlcNAc 2-Epimerase und NeuNAc Synthase untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass mit dem *xyn1* Promoter zwar eine Transkriptbildung nachweisbar ist, aber keine Enzymaktivität der beiden heterolog exprimierten Enzyme nachweisbar war. Es wurde daher nur mit den Stämmen, die die beiden Gene unter der Kontrolle des *pki* Promoters exprimierten, weitergearbeitet.

Die beiden Stämme PEC/PSC1 und PEC/PSC10 wurden weiterführend auf deren genomisches Kopienzahlenverhältnis von *tbage* und *tneub* untersucht. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

Tabelle 5: Vergleich der Gentranskription und Genkopienanzahl zwischen 2 transgenen *T. reesei* Stämmen

Genbezeichnung	Transkriptverhältnis	Kopienverhältnis
	PEC/PSC1 / PEC/PSC10 Median [95% K.I.]	PEC/PSC1 / PEC/PSC10 Median [95% K.I.]
tbage	2.021 [1.589-2.836]	1.810 [1.376-2.585]
tneub	0.479 [0.385-0.622]	0.400 [0.320-0.492]

Der PEC/PSC1 Stamm zeigt eine ungefähr 2 fach höhere Transkription des *tbage* Gens als der PEC/PSC10 Stamm. Im Gegensatz dazu verfügt der PEC/PSC10 Stamm über eine ungefähr 2 fach höhere Transkription des *tneub* Gens als der Stamm PEC/PSC1. Diese unterschiedlichen Transkriptniveaus können durch die unterschiedlichen Kopienzahlen der beiden Gene im Genom der zwei Stämme erklärt werden. Das Verhältnis der Kopienzahl in den beiden Stämmen wurde mittels qPCR von genomischer DNA gemessen, wobei als Referenz das Gen kodierend für die Pyruvatkinase (*pki*) diente. Die Kopienverhältnisse in den beiden Stämmen verhielten sich dabei wie die Transkriptverhältnisse, womit die unterschiedlichen Transkriptverhältnisse durch das Kopienzahlenverhältnis erklärbar sind und jede Kopie des Gens scheinbar mit der gleichen Effizienz transkribiert wird (Tabelle 5).

Heterologe Proteinexpression von GlcNAc 2-Epimerase und NeuNAc Synthase in *Trichoderma reesei*

Nach der Kultivierung des *Trichoderma reesei* Stammes wurde der zellfreie Extrakt auf die Gegenwart von GlcNAc 2-Epimerase und NeuNAc Synthase getestet. Die Umsetzung der Substrate PEP und GlcNAc hinzu ManNAc und NeuNAc wurde nach Zugabe des enzymhaltigen zellfreien Extraktes gemessen. Die Umsetzung wurde mittels HPLC-MS analysiert und die entsprechenden Chromatogramme sind in Abbildung 2 dargestellt. Als Positivkontrolle wurden GST-Fusionsproteine von GlcNAc 2-Epimerase (*tbage*) und NeuNAc Synthase (*tneub*), welche durch Expression in *E. coli* erzeugt wurden, in der Umsetzung eingesetzt.

Die Bildung von ManNAc und NeuNAc zeigt, dass die beiden synthetischen Gene *tbage* und *tneub* funktionell in *Trichoderma* expremiert werden (Fig. 2a2 und Fig. 2b2). Ebenso zeigt die Po-

sitivkontrolle mit den GST Fusionsproteinen die Bildung von ManNAC und NeuNAC (Fig. 2a1 und Fig. 2b1). Aber weder ManNAC noch NeuNAC werden in der Enzymreaktion gebildet, wenn ein Extrakt aus dem Ausgangsstamm QM9414 eingesetzt wird. Dieses Ergebnis zeigt, dass keine nennenswerte GlcNAC 2-Epimerase Aktivität im Ausgangsstamm vorhanden ist. Zudem wurde auch auf die reine NeuNAC Synthase Aktivität im Stamm QM9414 getestet, indem ManNAC und PEP als Substrat in der Enzymreaktion eingesetzt wurden. Aber auch in diesem Fall konnte keine Aktivität im Ausgangsstamm festgestellt werden, was die Vermutung nahelegt, dass keine NeuNAC Synthase noch GlcNAC 2-Epimerase Aktivität in natürlichen Isolaten von *Trichoderma reesei* besteht.

Wachstum von *Trichoderma reesei* auf kolloidalem Chitin und Freisetzung von GlcNAC

Um die Hydrolyse von Chitin in das Monomer GlcNAC zu untersuchen, kultivierten wir *T. reesei* PEC/PSC1 auf kolloidalem Chitin als Kohlenstoffquelle. Während der Anzucht wurde der Anstieg der Chitinaseaktivität verfolgt. Nach 90 h Anzuchtdauer erreichte die Chitinaseaktivität ein Maximum und der Überstand wurde auf die Fähigkeit zur Hydrolyse von Chitin getestet. Tabelle 6 präsentiert die Ergebnisse. Zehnmal mehr GlcNAC kann von kolloidalem Krabbenpanzerchitin freigesetzt werden als von unbehandeltem Krabbenpanzerchitin. Freigesetztes GlcNAC kann als Ausgangssubstanz für die Produktion von NeuNAC mit dem Stamm PEC/PSC1 genutzt werden.

Tabelle 6: Chitinaseaktivität gebildet durch Kultivierung von *T. reesei* PEC/PSC1 Stamm auf 1% Chitin.

Substrat	Chitinase Aktivität ^a [mU/mL]
crab-shell chitin	2,7 ± 0,5
colloidal crab-shell chitin	25,0 ± 0,9

^a 1U: Freisetzung von 1µmol GlcNac/min bei 37 °C

In vivo Bildung von NeuNAC in *T. reesei*

Im folgenden Experiment soll geklärt werden, ob die 2 heterolog expremierten Enzyme auch in vivo funktionstüchtig sind und

die Fähigkeit besitzen NeuNAC aus deren Nährsubstrat zu bilden. Dafür wurde der rekombinante Stamm PEC/PSC1 auf GlcNAC kultiviert. Als Negativkontrolle wurde der Ausgangsstamm QM9414 kultiviert. Von beiden Stämmen wurde das Myzel geerntet und auf die Anwesenheit von NeuNAC mittels HPLC-MS untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt.

Der rekombinante Stamm PEC/PSC1 bildet ManNAC (Abbildung 3a2) und NeuNAC (Abbildung 3b2, 10 µg pro g Trockenbiomasse). Dieses Ergebnis demonstriert, dass NeuNAC in *T. reesei* durch Koexpression zweier bakterieller Enzyme erzeugt werden kann. Der Ausgangsstamm QM9414 zeigt keine Bildung von NeuNAC noch von ManNAC (Fig. 3a3 and Fig. 3b3).

Zusammenfassung der Ergebnisse

In diesem Beispiel wurde die Einbringung eines intrazellulären Syntheseweges zur Herstellung von NeuNAC im Pilz *Trichoderma reesei* demonstriert. Nach bestem Wissen und Gewissen, ist das die erste Arbeit in der eine intrazelluläre zweistufige Enzymkaskade in einen filamentösen Pilz eingebracht wird um eine Feinchemikalie wie NeuNAC zu erzeugen. *T. reesei* ist selbst nicht in der Lage NeuNAC zu bilden, aber der wichtige intermediäre Metabolit GlcNAC wird von *T. reesei* gebildet. Diese Substanz wird bei der Depolymerisierung des erneuerbaren Rohstoffs Chitin freigesetzt (Tabelle 6). Aufgrund seiner saprophytischen Lebensweise, erzeugt *T. reesei* eine Vielzahl von Chitinasen (Tabelle 3) und kann das Polymer Chitin effektiv in sein Monomer GlcNAC zersetzen. Die spezifische Biosynthese von NeuNAC beginnt von Intermediaten des Chitin Stoffwechselwegs (GlcNAC bzw. UDP-GlcNAC) (vgl. Fig. 1), welche in *T. reesei* zur Verfügung stehen. Es können aber keine Gene in diesem Organismus gefunden werden, die eine Ähnlichkeit mit Genen kodierend für eine UDP-GlcNAC-2-Epimerase, eine ManNAC Kinase, eine NeuNAC-9-Phosphat Synthase noch eine NeuNAC-9-phosphatase besitzen. Ein alternativer Syntheseweg für NeuNAC, wie er in Bakterien vorkommt, benötigt die Aktivität einer GlcNAC-2-Epimerase und einer NeuNAC-Synthase (Fig. 1). Auch für diesen Weg existieren keine Gene in *Trichoderma reesei*.

In *Aspergillus fumigatus* ist die Anwesenheit von NeuNAC auf der Oberfläche von Konidien nachgewiesen worden, aber auf den Konidien des *Trichoderma reesei* Stammes QM9414 konnte keine NeuNAC gefunden werden. Weder die nötige Enzymaktivität noch

Spuren von ManNAc und NeuNAc konnten in diesem Stamm gemessen werden. Dies zeigt, dass *Trichoderma reesei* Stämme natürlicherweise weder NeuNAc noch ManNAc erzeugen können. Daher ist es notwendig die entsprechenden Enzymaktivitäten mittels heterologer Expression in diesem Organismus zu erzeugen um NeuNAc zu produzieren. Das erste Enzym in der Kaskade, eine GlcNAc 2-Epimerase, wurde aus *Anabaena* sp. genommen. Dieses Enzym ist gut charakterisiert und benötigt eine vergleichsweise geringe Menge des Kofaktors ATP (20 μ M) um seine maximale Aktivität zu entfalten.

Das zweite Enzym, eine NeuNAc Synthase, wurde aus *C. jejuni* gewählt. Die Kodonverwendung beider Gene wurde auf die Kodonverwendung von *Trichoderma reesei* optimiert um die Expression der bakteriellen Gene im Pilzwirt zu verbessern. Für die Expression der Gene wurde einerseits der konstitutive Promoter des *pki* Gens, sowie der gut regulierbare Promoter des *xyn1* Gens gewählt. Unter der Kontrolle des *xyn1* Promoters konnte keine erfolgreiche Expression der beiden Gene erzielt werden. Zwar konnte gezeigt werden, dass die Gene transkribiert werden, aber keine Enzymaktivität konnte nachgewiesen werden. Unter der Kontrolle des *pki* Promoters können die beiden heterolog expremierten Gene aber nicht nur transkribiert werden, sondern es konnte auch die korrespondierende Enzymaktivität nachgewiesen werden. In einem Stamm, der beide Gene unter dem konstitutiven *pki* Promoters expremiert, konnte die Bildung von NeuNAc auch *in vivo* gezeigt werden. Dazu wurde der Pilz auf dem Biopolymer Chitin kultiviert, was zur Freisetzung des Monomers GlcNAc führte. Bei Kultivierung des rekombinanten Stammes konnte die Bildung von NeuNAc im Myzel nachgewiesen werden (Fig. 3b2).

Durch Einbringung einer zweistufigen Enzymkaskade in *Trichoderma reesei* wurde gezeigt, dass der Pilz die Fähigkeit erlangt hat NeuNAc zu erzeugen. Dieses Beispiel zeigt auf, dass hochwertige Feinchemikalien aus einem erneuerbaren Rohstoff, wie hier aus Chitin, erzeugt werden können. Aber nicht nur Chitin sondern eine Vielzahl von anderen Kohlenstoffquellen, wie zum Beispiel Zellulose und Hemizellulosen, können von dem saprophytischen Pilz *Trichoderma reesei* genutzt werden und unterstreichen dessen Potential als Zellfabrik für die Herstellung von verschiedenen Chemikalien eingesetzt zu werden.

Patentansprüche:

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül umfassend mindestens einen in Pilzzellen der Gattung *Trichoderma* aktiven Promoter an dem jeweils eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eine N-Acetylglukosamin-2-Epimerase und/oder eine N-Acetylneuraminsäure-Synthase operativ gebunden ist, wobei der mindestens eine in Pilzzellen aktive Promoter ein konstitutiver Promoter ist.
2. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Pilzzellen der Gattung *Trichoderma reesei* Zellen sind.
3. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der konstitutive Promoter ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Promotoren der Glykolysegene, insbesondere *pki*, *gpd* oder *zwf1*, *tefla*, *act*, *cox4*, *neg1* und *sar1*.
4. Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3.
5. Pilzzelle der Gattung *Trichoderma* umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder einen Vektor gemäß Anspruch 4.
6. Pilzzelle gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Pilzzelle der Gattung *Trichoderma reesei* ist.
7. Pilzzelle gemäß Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass diese mindestens ein Nukleinsäuremolekül umfasst dessen Nukleinsäuresequenz für eine N-Acetylglukosamin-2-Epimerase und eine N-Acetylneuraminase-Synthase codiert und operativ an einen in Pilzzellen aktiven konstitutiven Promoter gebunden ist.
8. Verfahren zur Herstellung von N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc) umfassend das Kultivieren von Pilzzellen der Gattung *Trichoderma* gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7 in Anwesenheit einer N-Acetyl-D-glukosamin-Quelle.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die N-Acetyl-D-glukosamin-Quelle Chitin ist.

1/5

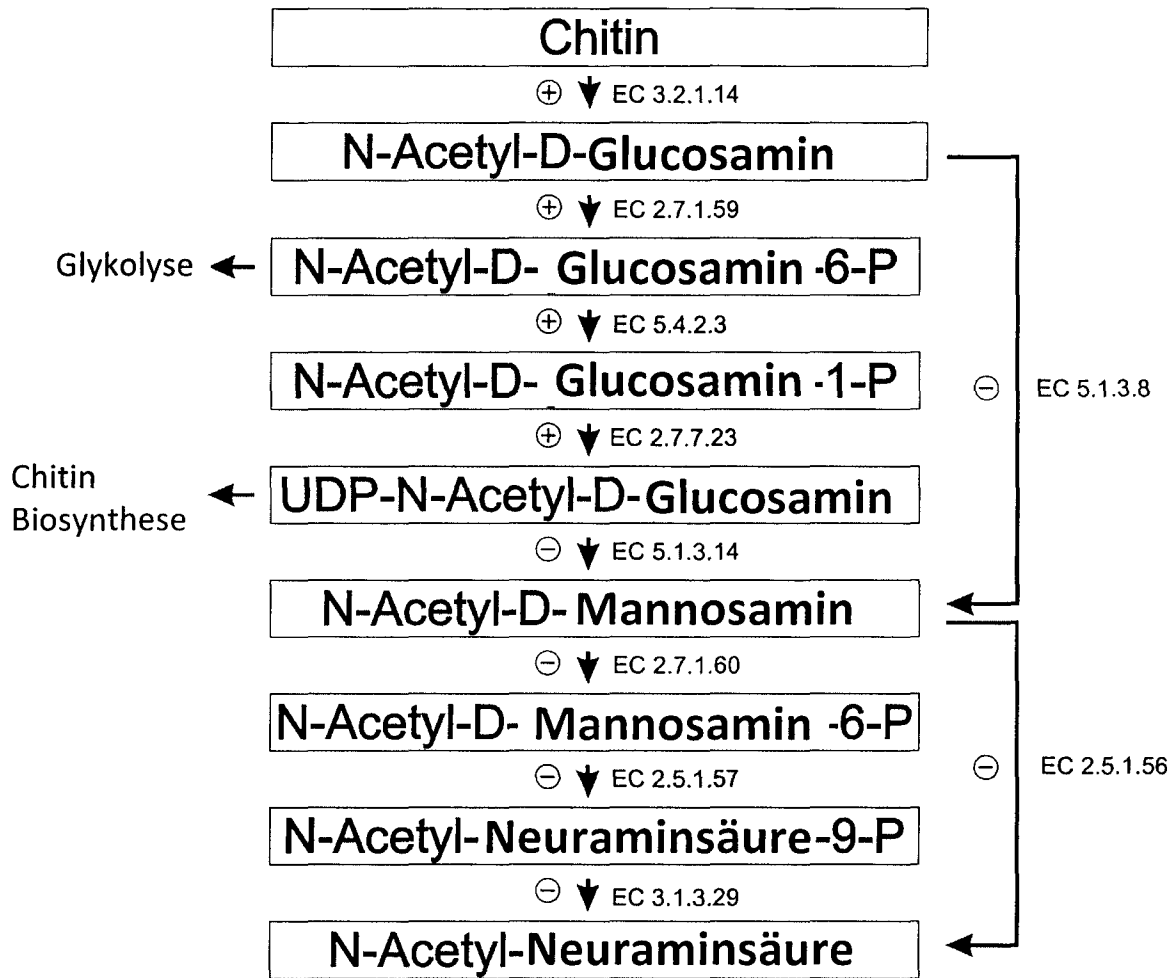


Fig. 1

2/5

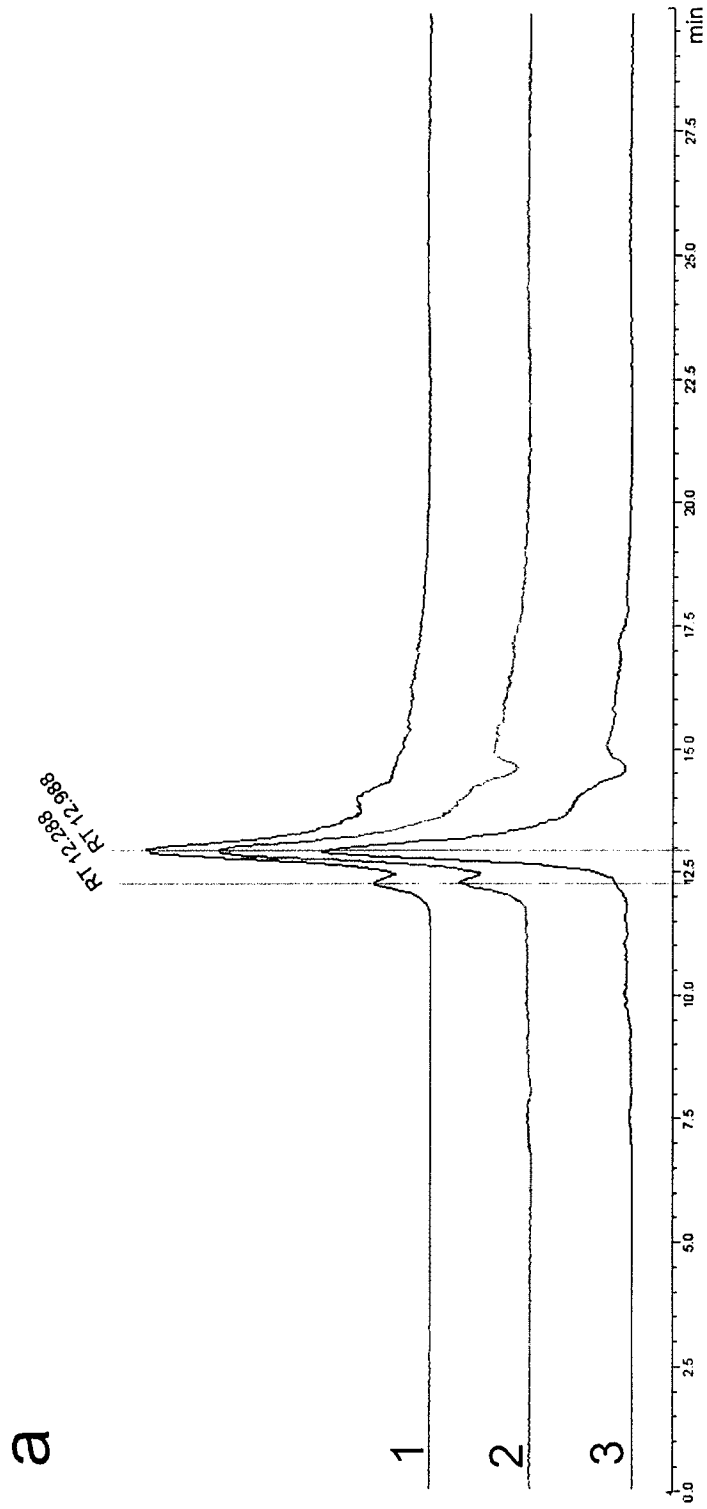


Fig. 2a

4/5

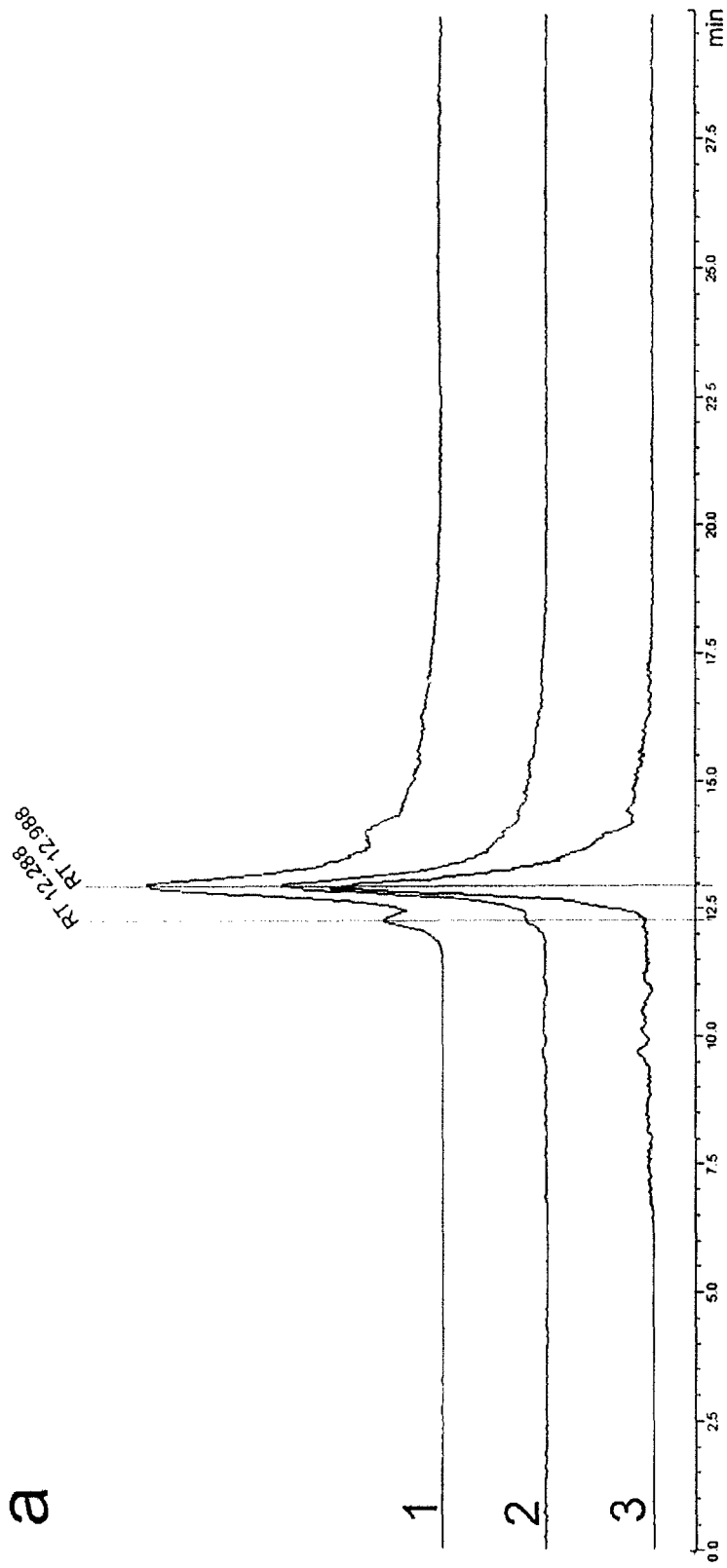


Fig. 3a

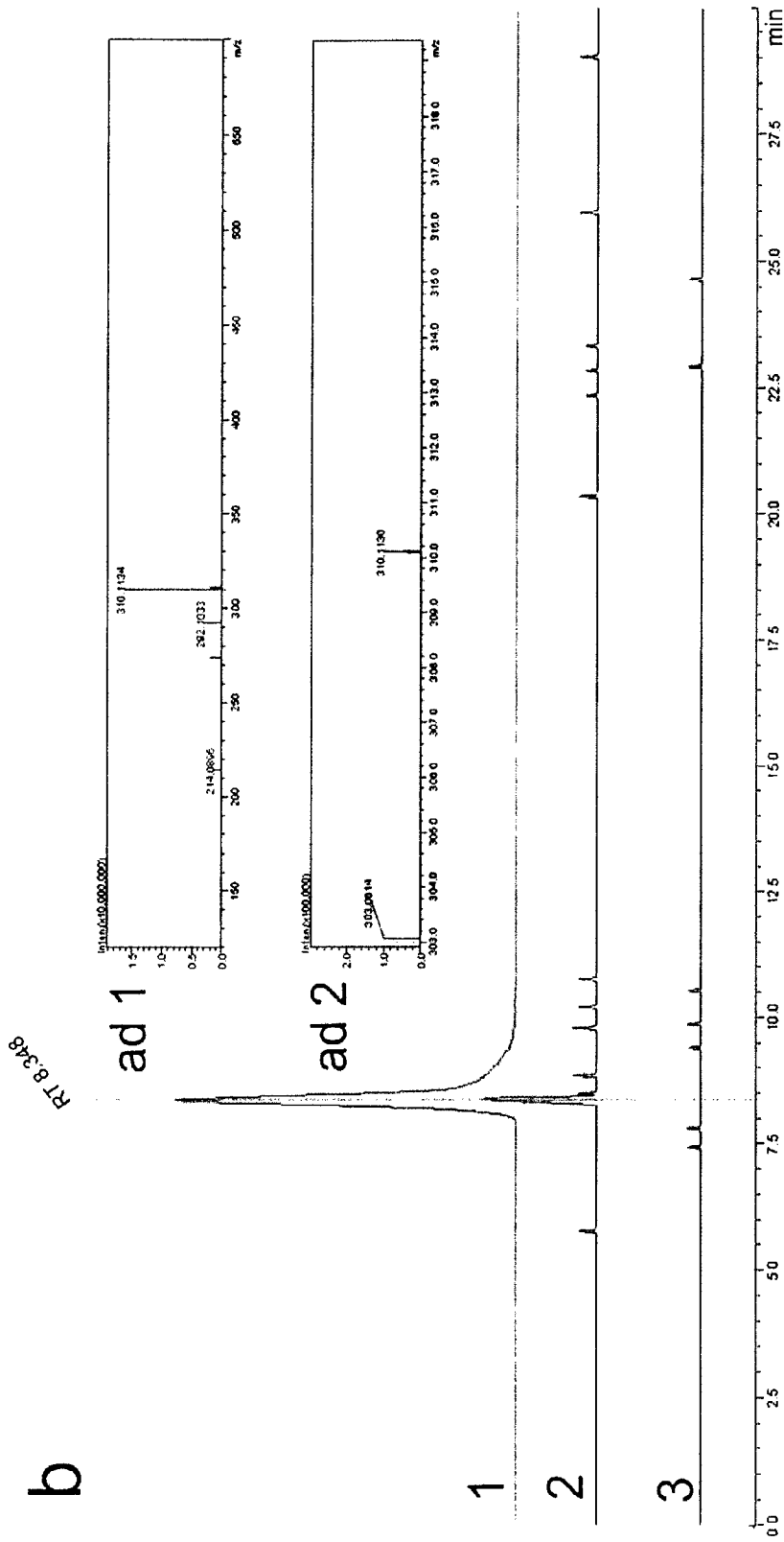


Fig. 3b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/AT2011/000510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C12N9/10 C12N9/90 C12N15/80 C12P19/26
 ADD.
 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)
 C12N C12P
 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)
 EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	MATTHIAS G STEIGER ET AL: "Synthesis of an antiviral drug precursor from chitin using a saprophyte as a whole-cell catalyst", MICROBIAL CELL FACTORIES, vol. 10, no. 1, 5 December 2011 (2011-12-05), page 102, XP55025863, ISSN: 1475-2859, DOI: 10.1186/1475-2859-10-102 the whole document ----- -/--	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 9 May 2012	Date of mailing of the international search report 16/05/2012
--	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Giebeler, Katharina
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/AT2011/000510

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 081 230 A2 (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP] KYOWA HAKKO BIO CO LTD [JP]) 7 March 2001 (2001-03-07) cited in the application	1-4
Y	the whole document paragraph [0032] paragraph [0045] - paragraph [0046] -----	1-9
X	EP 1 154 018 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP]) 14 November 2001 (2001-11-14) cited in the application	1-4
Y	the whole document paragraph [0036] - paragraph [0037] -----	1-9
X	WO 2005/090552 A2 (GLYCOFI INC [US]; HAMILTON STEPHEN R [US]) 29 September 2005 (2005-09-29)	1-6
Y	the whole document paragraph [0051] paragraph [0033] paragraph [0019] -----	1-9
X	BLUME A ET AL: "UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase, functionally expressed in and purified from Escherichia coli, yeast, and insect cells", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 35, no. 2, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 387-396, XP004506578, ISSN: 1046-5928, DOI: 10.1016/J.PEP.2004.02.013 the whole document -----	1-4
Y	EP 1 484 406 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP]) 8 December 2004 (2004-12-08) cited in the application the whole document -----	1-9
Y	KAZUHIKO TABATA ET AL: "Production of N-acetyl-d-neuraminic acid by coupling bacteria expressing N-acetyl-d-glucosamine 2-epimerase and N-acetyl-d-neuraminic acid synthetase", ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, vol. 30, no. 3, 1 March 2002 (2002-03-01), pages 327-333, XP55026513, ISSN: 0141-0229, DOI: 10.1016/S0141-0229(01)00515-4 the whole document -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/AT2011/000510

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1081230	A2	07-03-2001	AT 486949 T 15-11-2010
			CA 2317118 A1 28-02-2001
			CN 1286308 A 07-03-2001
			EP 1081230 A2 07-03-2001
			ES 2352669 T3 22-02-2011
			JP 3946423 B2 18-07-2007
			JP 2001136982 A 22-05-2001
			KR 20010050270 A 15-06-2001
			US 6846656 B1 25-01-2005
EP 1154018	A1	14-11-2001	AU 2459300 A 29-08-2000
			CN 1340100 A 13-03-2002
			EP 1154018 A1 14-11-2001
			JP 3939096 B2 27-06-2007
			WO 0047730 A1 17-08-2000
WO 2005090552	A2	29-09-2005	AU 2005224672 A1 29-09-2005
			CA 2558635 A1 29-09-2005
			EP 1730293 A2 13-12-2006
			EP 2365089 A1 14-09-2011
			JP 2007529228 A 25-10-2007
			WO 2005090552 A2 29-09-2005
EP 1484406	A1	08-12-2004	AU 2003220850 A1 09-09-2003
			EP 1484406 A1 08-12-2004
			JP 4318549 B2 26-08-2009
			US 2005142643 A1 30-06-2005
			WO 03072783 A1 04-09-2003

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12N9/10 C12N9/90 C12N15/80 C12P19/26 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12N C12P		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P	MATTHIAS G STEIGER ET AL: "Synthesis of an antiviral drug precursor from chitin using a saprophyte as a whole-cell catalyst", MICROBIAL CELL FACTORIES, Bd. 10, Nr. 1, 5. Dezember 2011 (2011-12-05), Seite 102, XP55025863, ISSN: 1475-2859, DOI: 10.1186/1475-2859-10-102 das ganze Dokument ----- -/--	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. 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 Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
9. Mai 2012	16/05/2012	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Giebeler, Katharina	

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 1 081 230 A2 (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP] KYOWA HAKKO BIO CO LTD [JP]) 7. März 2001 (2001-03-07) in der Anmeldung erwähnt	1-4
Y	das ganze Dokument Absatz [0032] Absatz [0045] - Absatz [0046] -----	1-9
X	EP 1 154 018 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP]) 14. November 2001 (2001-11-14) in der Anmeldung erwähnt	1-4
Y	das ganze Dokument Absatz [0036] - Absatz [0037] -----	1-9
X	WO 2005/090552 A2 (GLYCOFI INC [US]; HAMILTON STEPHEN R [US]) 29. September 2005 (2005-09-29)	1-6
Y	das ganze Dokument Absatz [0051] Absatz [0033] Absatz [0019] -----	1-9
X	BLUME A ET AL: "UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase, functionally expressed in and purified from Escherichia coli, yeast, and insect cells", PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, Bd. 35, Nr. 2, 1. Juni 2004 (2004-06-01), Seiten 387-396, XP004506578, ISSN: 1046-5928, DOI: 10.1016/J.PEP.2004.02.013 das ganze Dokument	1-4
Y	EP 1 484 406 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP]) 8. Dezember 2004 (2004-12-08) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-9
Y	KAZUHIKO TABATA ET AL: "Production of N-acetyl-d-neuraminic acid by coupling bacteria expressing N-acetyl-d-glucosamine 2-epimerase and N-acetyl-d-neuraminic acid synthetase", ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY, Bd. 30, Nr. 3, 1. März 2002 (2002-03-01), Seiten 327-333, XP55026513, ISSN: 0141-0229, DOI: 10.1016/S0141-0229(01)00515-4 das ganze Dokument -----	1-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT2011/000510

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1081230	A2	07-03-2001	AT 486949 T 15-11-2010
			CA 2317118 A1 28-02-2001
			CN 1286308 A 07-03-2001
			EP 1081230 A2 07-03-2001
			ES 2352669 T3 22-02-2011
			JP 3946423 B2 18-07-2007
			JP 2001136982 A 22-05-2001
			KR 20010050270 A 15-06-2001
			US 6846656 B1 25-01-2005

EP 1154018	A1	14-11-2001	AU 2459300 A 29-08-2000
			CN 1340100 A 13-03-2002
			EP 1154018 A1 14-11-2001
			JP 3939096 B2 27-06-2007
			WO 0047730 A1 17-08-2000

WO 2005090552	A2	29-09-2005	AU 2005224672 A1 29-09-2005
			CA 2558635 A1 29-09-2005
			EP 1730293 A2 13-12-2006
			EP 2365089 A1 14-09-2011
			JP 2007529228 A 25-10-2007
			WO 2005090552 A2 29-09-2005

EP 1484406	A1	08-12-2004	AU 2003220850 A1 09-09-2003
			EP 1484406 A1 08-12-2004
			JP 4318549 B2 26-08-2009
			US 2005142643 A1 30-06-2005
			WO 03072783 A1 04-09-2003
