**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

**(51) Internationale Patentklassifikation** 6 :
**C12N 15/31, 15/70, 15/62, C07K 14/32, C12N 1/21, A61K 39/07**

**A1**

**(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/28263**

**(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:** 7. August 1997 (07.08.97)

**(21) Internationales Aktenzeichen:** PCT/EP97/00432

**(22) Internationales Anmeldedatum:** 31. Januar 1997 (31.01.97)

**(30) Prioritätsdaten:**
196 03 649.6 1. Februar 1996 (01.02.96) DE

**(71)(72) Anmelder und Erfinder:** LUBITZ, Werner [AT/AT]; Schönborngasse 12/7, A-1080 Wien (AT). SLEYTR, Uwe [AT/AT]; Parhamerplatz 10, A-1170 Wien (AT).

**(72) Erfinder; und**
**(75) Erfinder/Anmelder** *(nur für US)*: KUEN, Beatrix [AT/AT]; Kaiserstrasse 107/21, A-1070 Wien (AT). TRUPPE, Michaela [AT/AT]; Tulpenstrasse 6, A-4222 Luftenberg (AT). HOWORKA, Stefan [AT/AT]; Hietzinger Hauptstrasse 42d/b, A-1130 Wien (AT). RESCH, Stepanka [AT/AT]; Kranzgasse 7/28, A-1150 Wien (AT). SCHROLL, Gerhard [AT/AT]; Maria Hilferstrasse 110/6, A-1070 Wien (AT). SARA, Margit [AT/AT]; Watzekgasse 84, A-2230 Gänsemdorf (AT).

**(74) Anwälte:** WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).

**(81) Bestimmungsstaaten:** AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO Patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht**
*Mit internationalem Recherchenbericht.*
*Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.*

**(54) Title:** RECOMBINANT EXPRESSION OF S-LAYER PROTEINS

**(54) Bezeichnung:** REKOMBINANTE EXPRESSION VON S-LAYER-PROTEINEN

**(57) Abstract**

The invention concerns processess for the recombinant preparation of S-layer proteins in gram-negative host cells. In addition, the nucleotide sequence of a new S-layer gene and a process for preparation of modified S-layer proteins is disclosed.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft Verfahren zur rekombinanten Herstellung von S-Layer-Proteinen in gram-negativen Wirtszellen. Weiterhin werden die Nukleotidsequenz eines neuen S-Layer-Gens und Verfahren zur Herstellung modifizierter S-Layer-Proteine offenbart.

*LEDIGLICH ZUR INFORMATION*

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

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **AM** | Armenien | **GB** | Vereinigtes Königreich | **MX** | Mexiko |
| **AT** | Österreich | **GE** | Georgien | **NE** | Niger |
| **AU** | Australien | **GN** | Guinea | **NL** | Niederlande |
| **BB** | Barbados | **GR** | Griechenland | **NO** | Norwegen |
| **BE** | Belgien | **HU** | Ungarn | **NZ** | Neuseeland |
| **BF** | Burkina Faso | **IE** | Irland | **PL** | Polen |
| **BG** | Bulgarien | **IT** | Italien | **PT** | Portugal |
| **BJ** | Benin | **JP** | Japan | **RO** | Rumänien |
| **BR** | Brasilien | **KE** | Kenya | **RU** | Russische Föderation |
| **BY** | Belarus | **KG** | Kirgisistan | **SD** | Sudan |
| **CA** | Kanada | **KP** | Demokratische Volksrepublik Korea | **SE** | Schweden |
| **CF** | Zentrale Afrikanische Republik | **KR** | Republik Korea | **SG** | Singapur |
| **CG** | Kongo | **KZ** | Kasachstan | **SI** | Slowenien |
| **CH** | Schweiz | **LI** | Liechtenstein | **SK** | Slowakei |
| **CI** | Côte d'Ivoire | **LK** | Sri Lanka | **SN** | Senegal |
| **CM** | Kamerun | **LR** | Liberia | **SZ** | Swasiland |
| **CN** | China | **LK** | Litauen | **TD** | Tschad |
| **CS** | Tschechoslowakei | **LU** | Luxemburg | **TG** | Togo |
| **CZ** | Tschechische Republik | **LV** | Lettland | **TJ** | Tadschikistan |
| **DE** | Deutschland | **MC** | Monaco | **TT** | Trinidad und Tobago |
| **DK** | Dänemark | **MD** | Republik Moldau | **UA** | Ukraine |
| **EE** | Estland | **MG** | Madagaskar | **UG** | Uganda |
| **ES** | Spanien | **ML** | Mali | **US** | Vereinigte Staaten von Amerika |
| **FI** | Finnland | **MN** | Mongolei | **UZ** | Usbekistan |
| **FR** | Frankreich | **MR** | Mauretanien | **VN** | Vietnam |
| **GA** | Gabon | **MW** | Malawi | | |

# Rekombinante Expression von S-Layer-Proteinen

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur rekombinanten Herstellung von S-Layer-Proteinen und modifizierten S-Layer-Proteinen in gram-negativen Wirtszellen.

Kristalline bakterielle Zelloberflächenlayer (S-Layer) bilden in vielen Eubakterien und den allermeisten Archaebakterien die äußerste Zellwandkomponente (Sleytr et al. (1988), Crystalline Bacterial Cell Surface Layers, Springer Verlag Berlin; Messner und Sleytr, Adv.Mikrob.Physiol.33 (1992), 213-275). Die meisten der gegenwärtig bekannten S-Layer-Proteine sind aus identischen Proteinen bzw. Glykoproteinen zusammengesetzt, die scheinbare Molekulargewichte im Bereich von 40 000 bis 220 000 aufweisen. Die Komponenten von S-Layern sind selbst-assemblierend und die meisten Gitter haben eine schräge (p2), quadratische (p4) oder hexagonale (p6) Symmetrie. Die Funktionen von bakteriellen S-Layern sind immer noch nicht vollständig bekannt, aber aufgrund ihrer Lokalisierung an der Zelloberfläche dürften die porösen kristallinen S-Layer hauptsächlich als Schutzhüllen, Molekularsiebe oder zur Förderung der Zelladhäsion und Oberflächenerkennung dienen.

Genetische Daten und Sequenzinformationen sind für verschiedene S-Layer-Gene aus Mikroorganismen bekannt. Eine Übersicht findet sich bei Peyret et al., Mol.Mikrobiol.9 (1993), 97-109. Auf diese Daten wird ausdrücklich Bezug genommen. Die Sequenz des für das S-Layer-Protein von B.stearothermophilus PV72 kodierenden Gens sbsA und ein Verfahren zu dessen Klonierung sind bei Kuen et al. (Gene 145 (1994), 115-120) angegeben.

B.stearothermophilus PV72 ist ein gram-positives Bakterium, das mit einem hexagonal angeordneten S-Layer bedeckt ist. Die Hauptkomponente des S-Layer ist ein 128 kd-Protein, bei dem es

sich um das häufigste Protein in der Zelle mit einem Anteil von ungefähr 15% bezüglich der gesamten Proteinbestandteile handelt. Es sind verschiedene Stämme von B.stearothermophilus charakterisiert worden, die hinsichtlich des Typs von S-Layer-Gitter, dem Molekulargewicht und der Glykosilierung der S-Layer-Komponenten unterschiedlich sind (Messner und Sleytr (1992), supra).

Die deutsche Patentanmeldung P 44 25 527.6 offenbart den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt des S-Layer-Gens aus B.stearothermophilus und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Spaltstelle zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Protein befindet sich zwischen Position 30 und 31 der Aminosäuresequenz. Die Signalpeptid-kodierende Nukleinsäure kann operativ mit einer Protein-kodierenden Nukleinsäure verknüpft werden und zur rekombinanten Herstellung von Proteinen in einem Verfahren verwendet werden, bei dem man eine transformierte Wirtszelle bereitstellt, die Wirtszelle unter Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung und Sekretion des davon kodierten Polypeptids führen, und das resultierende Polypeptid aus dem Kulturmedium gewinnt. Als Wirtszellen werden vorzugsweise prokaryontische Organismen, insbesondere gram-positive Organismen der Gattung Bacillus genannt.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die rekombinante Herstellung von S-Layer-Proteinen nicht nur in gram-positiven prokaryontischen Wirtszellen, sondern auch in gram-negativen prokaryontischen Wirtszellen möglich ist. Dabei bildet sich das S-Layer-Protein im Inneren der Wirtszelle nicht in Form von ungeordneten Einschlußkörpern, sondern unerwarteterweise in Form von geordneten monomolekularen Schichten.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von S-Layer-Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man (a) eine gram-negative prokaryontische Wirtszelle bereitstellt, die transformiert ist mit

einer für ein S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure, ausgewählt aus (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt, (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt; (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen und (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle gewinnt.

Unter dem Begriff "stringente Hybridisierung" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man, daß eine Hybridisierung auch nach Waschen bei 55°C, vorzugsweise 60°C, in einem wäßrigen Niedrigsalz-Puffer (z.B. 0,2 xSSC) noch auftritt (s. auch Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual).

Das erfindungsgemäße Verfahren wird in gram-negativen prokaryontischen Wirtszellen durchgeführt. Dabei wird überraschenderweise im Zellinneren eine geordnete S-Layer-Proteinstruktur erhalten. Vorzugsweise werden als Wirtszellen Enterobakterien, insbesondere E.coli, verwendet. Besonders bevorzugt ist der E.coli-Stamm pop2125, der am 31.01.1996 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D 38124 Braunschweig unter dem Aktenzeichen DSM 10509 hinterlegt wurde.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch zur Gewinnung rekombinanter S-Layer-Proteine eingesetzt werden. Hierzu verwendet man eine für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure, die eine oder mehrere Insertionen enthält, die für Peptid- oder Polypeptidsequenzen kodieren. Diese Insertionen können einerseits nur für Peptide mit wenigen Aminosäuren, z.B. 1-25 Ami-

nosäuren, kodieren. Andererseits können die Insertionen auch für größere Polypeptide von z.B. bis zu 1000 Aminosäuren und vorzugsweise bis zu 500 Aminosäuren kodieren, ohne daß die Fähigkeit des S-Layer-Proteins zur Ausbildung einer korrekt gefalteten Struktur verlorengeht. Neben den Insertionen kann das rekombinante S-Layer-Protein auch Aminosäuresubstitutionen, insbesondere Substitutionen einzelner Aminosäuren im Bereich der Insertionsorte sowie gegebenenfalls Deletionen einzelner Aminosäuren oder kurzer Aminosäureabschnitte von bis zu 30 Aminosäuren aufweisen.

Als Insertionsstellen für Polypeptid-kodierende Sequenzen bevorzugt sind Bereiche zwischen den Positionen 1-1200 und 2200-3000 der in SEQ ID NO.1 gezeigten Nukleotidsequenz. Besonders bevorzugte Insertionsstellen sind die NruI-Schnittstelle an Position 582, die PvuII-Schnittstelle an Position 878, die SnaB-I-Schnittstelle an Position 917, die PvuII-Schnittstelle an Position 2504 und die PvuII-Schnittstelle an Position 2649. Die Insertion einer für Streptavidin kodierenden Nukleinsäuresequenz konnte bereits in die NruI-Schnittstelle an Position 581 gezeigt werden.

Die Peptid- oder Polypeptid-kodierenden Insertionen werden vorzugsweise ausgewählt aus Nukleotidsequenzen, die für Cysteinreste, Bereiche mit mehreren geladenen Aminosäuren, z.B. Arg, Lys, Asp oder Glu, oder Tyr-Resten, DNA-bindende Epitope, antigene, allergene oder immunogene Epitope, metallbindende Epitope, Streptavidin, Enzyme, Cytokine oder Antikörper-bindende Proteine kodieren.

Ein besonders bevorzugtes Beispiel für eine Insertion in die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure ist eine für Streptavidin kodierende Nukleotidsequenz. Auf diese Weise können universelle Trägermoleküle erhalten werden, die zur Ankopplung von biotinylierten Reagenzien und zum Nachweis in immunologischen oder Hybridisierungstestverfahren geeignet sind.

Ein weiteres bevorzugtes Beispiel für Insertionen sind antigene allergene oder immunogene Epitope, z.B. Epitope aus pathogenen Mikroorganismen, wie etwa Bakterien, Pilzen, Parasiten etc. und Viren, oder Epitope aus Pflanzen oder Epitope gegen körpereigene Substanzen, z.B. Cytokine, sowie gegen Toxine, insbesondere Endotoxine. Besonders bevorzugte Beispiele für immunogene Epitope sind Epitope aus Herpesviren, wie etwa Herpesvirus 6 oder Pseudorabiesvirus (Lomniczi et al., J. Virol. 49 (1984), 970-979), insbesondere Epitope aus den Genen gB, gC oder/und gD, oder Maul- und Klauenseuchevirus (FMDV), insbesondere Epitope aus den Genabschnitten , die für VP1, VP2 oder/und VP3 kodieren. Die immunogenen Epitope können so ausgewählt werden, daß sie die Erzeugung einer Antikörper-vermittelten Immunreaktion fördern oder/und die Erzeugung einer zellulären Immunreaktion, z.B. durch Stimulation von T-Zellen, fördern. Beispiele für geeignete allergene Epitope sind Birkenpollenallergene, z.B. Bet v I (Ebner et al., J. Immunol. 150 (1993) 1047-1054). Weiterhin besonders bevorzugt sind antigene Epitope, die in der Lage sind, aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten körpereigene oder körperfremde Substanzen wie etwa Cytokine oder Toxine zu binden und herauszufiltrieren. Derartige Epitope können Bestandteile von Cytokin- oder Toxinrezeptoren oder von Antikörpern gegen Cytokine oder Toxine umfassen.

Andererseits können die Insertionen auch für Enzyme kodieren. Bevorzugte Beispiele sind Enzyme zur Synthese von Polyhydroxybuttersäure, z.B. PHB-Synthase. Durch Einbau von PHB-Synthase in den S-Layer kann bei Zufuhr des Substrats Hydroxybuttersäure unter geeigneten Bedingungen eine molekulare Spinndüse entstehen. Ein weiteres bevorzugtes Beispiel für ein Enzym ist bakterielle Luciferase. Hier kann bei Zufuhr des Enzymsubstrates, eines Aldehyds, und in Anwesenheit von $O_2$ ein molekularer Laser erhalten werden.

Ebenfalls bevorzugt sind Insertionen, die für Cytokine, wie etwa Interleukine, Interferone oder Tumornekrosefaktoren ko-

dieren. Diese Moleküle können beispielsweise in Kombination mit immunogenen Epitopen zur Herstellung von Vakzinen verwendet werden.

Schließlich sind auch Insertionen bevorzugt, die für Antikörper-bindende Proteine, wie etwa Protein-A oder Protein-G oder für DNA- oder/und metallbindende Epitope, wie etwa Leucin-Zipper, Zinkfinger etc. kodieren.

So wird durch die vorliegende Erfindung erstmals eine Zelle bereitgestellt, die im Cytoplasma immobilisierte rekombinante Polypeptide in nativer Form, z. B. aktive Enzyme enthält. Pro $m^2$ rekombinanten S-Layer können auf diese Weise 50.000 - 200.000, z. B. ca. 100.000 rekombinante Moleküle immobilisiert werden. Pro kg rekombinante E.coli Zellen können bis zu 3.000 $m^2$ S-Layer erhalten werden.

Vorzugsweise wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure in operativer Verknüpfung mit einer für ein Signalpeptid von gram-positiven Bakterien kodierenden Nukleinsäure verwendet, d.h. 5'-seitig von der S-Layer-Protein-kodierenden Nukleinsäure ist die Signalpeptid-kodierende Nukleinsäure angeordnet. Überraschenderweise wurde nämlich festgestellt, daß die Anwesenheit derartiger Signalpeptidsequenzen, die in den erfindungsgemäß verwendeten gram-negativen Wirtszellen nicht abgespalten werden, die Stabilität der S-Layer-Strukturen verbessern kann. Besonders bevorzugt umfaßt die für das Signalpeptid kodierende Nukleinsäure (a) den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt der in SEQ ID NO.1 dargestellten Nukleotidsequenz, (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder/und (c) eine zu den Sequenzen aus (a) oder/und (b) mindestens 80% und insbesondere mindestens 90% homologe Nukleotidsequenz.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein rekombinantes S-Layer-Protein

kodiert und ausgewählt ist aus (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt, (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

In SEQ ID NO.1 ist die kodierende Nukleotidsequenz des S-Layer-Gens sbsA aus B.stearothermophilus einschließlich des Signalpeptid-kodierenden Abschnitts gezeigt. Der Signalpeptid-kodierende Abschnitt reicht von Position 1-90 der in SEQ ID NO.1 gezeigten Nukleotidsequenz. Der für das reife SbsA-Polypeptid kodierende Abschnitt reicht von Position 91-3684.

Das sbsA-Gen von B.stearothermophilus kodiert für ein Protein mit insgesamt 1228 Aminosäuren einschließlich eines N-terminalen Signalpeptids mit 30 Aminosäuren (SEQ ID NO.2). Die Spaltstelle zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Protein befindet sich zwischen Position 30 und 31 der Aminosäuresequenz. Das Signalpeptid weist eine basische aminoterminale Domäne, gefolgt von einer hydrophoben Domäne, auf.

Sequenzvergleiche mit anderen Signalpeptiden zeigen eine gewisse Homologie zu Signalpeptiden von extrazellulären Proteinen in Bazillen, wie etwa alkalische Phosphatase und neutrale Phosphatase von B.amyloliquefaciens (Vasantha et al., J.Bacteriol.159 (1984), 811-819) sowie mit den Signalpeptiden für das B.sphaericus-Gen 125 (Bowditch et al., J.Bacteriol.171 (1989), 4178-4188) und das OWP-Gen von B.brevis (Tsuboi et al., J.Bacteriol.168 (1986), 365-373).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinanter Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Der Vektor ist vorzugsweise

in Prokaryonten replizierbar. Besonders bevorzugt ist der Vektor ein prokaryontisches Plasmid.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einer Nukleinsäure oder einem rekombinanten Vektor gemäß vorliegender Erfindung transformiert ist. Vorzugsweise ist die Zelle ein gram-negativer prokaryontischer Organismus und am meisten bevorzugt eine E.coli-Zelle. Die erfindungsgemäße Zelle kann in ihrem Inneren eine rekombinante S-Layerstruktur enthalten. Verfahren zur Tranformation von Zellen mit Nukleinsäuren sind allgemeiner Stand der Technik (siehe Sambrook et al., supra) und brauchen daher nicht erläutert zu werden.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinantes S-Layer-Protein, das innerhalb der in SEQ ID NO.2 gezeigten Aminosäuresequenz mindestens eine Peptid- oder/und Polypeptidinsertion enthält. Bevorzugte Beispiele für Peptid- und Polypeptidinsertionen wurden bereits erläutert.

Aus erfindungsgemäßen rekombinanten S-Layer-Proteinmolekülen kann eine rekombinante S-Layer-Struktur assembliert werden, die als Untereinheit mindestens ein erfindungsgemäßes rekombinantes S-Layer-Protein enthält. Weiterhin ist bevorzugt, daß die erfindungsgemäße S-Layer-Struktur als "Verdünnungsmoleküle" auch nichtmodifizierte S-Layer-Proteine enthält. Die nichtmodifizierten S-Layer-Proteine liegen vorzugsweise in einem molaren Anteil von 10-99% bezüglich der gesamten S-Layer-Proteine vor.

Die erfindungsgemäße S-Layer-Struktur kann mehrere kovalent oder durch Affinitätsbindung miteinander verknüpfte Schichten umfassen. Kovalente Verknüpfungen können beispielsweise durch Insertionen von Cysteinresten und einer anschließenden Ausbildung von Cystinbrücken eingeführt werden. Verknüpfungen durch Affinitätsbindung umfassen beispielsweise Antikörper-

Antigen-, Antikörper-Protein A- bzw. -Protein G- oder Streptavidin-Biotin-Wechselwirkungen.

S-Layer-Strukturen, die rekombinante S-Layer-Proteine enthalten, können gegebenenfalls auch in trägergebundener Form hergestellt werden. Hierzu kann die Reassemblierung der S-Layer-Struktur aus einzelnen Einheiten in Gegenwart eines Peptidoglycanträgers erfolgen, wobei beispielsweise Peptidoglycanschichten erzeugt werden, die auf einer oder auf beiden Seiten mit einer S-Layer-Struktur überzogen sind. Eine andere Möglichkeit zur Herstellung trägergebundener S-Layer-Strukturen besteht darin, eine S-Layer-Schicht an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien, z.B. Wasser/Luft, zu erzeugen und diese Schicht auf einer Festphase, z.B. einer Filtermembran, zu immobilisieren (vgl. z.B. Pum und Sleytr (1994), Thin Solid Films 244, 882-886; Küpcü et al. (1995), Biochim. Biophys. Acta 1235, 263-269).

Die erfindungsgemäßen rekombinanten S-Layer-Proteine und S-Layer-Strukturen sind für eine Vielzahl von Anwendungen geeignet. Besonders bevorzugt ist die Verwendung als Vakzin oder Adjuvans, wobei man rekombinante S-Layer-Proteine verwendet, die immunogene Epitope von Pathogenen und/oder körpereigene immunstimulierende Polypeptide, wie etwa Cytokine, enthalten. Bei dieser Anwendung ist nicht unbedingt eine Reinigung der rekombinanten S-Layer-Proteine erforderlich. Stattdessen kann beispielsweise die Verwendung in Kombination mit einem Bakterienghost erfolgen, der ggf. in seiner Membran zusätzliche immunogene Epitope enthält.

Die Herstellung geeigneter "Bakterienghosts" ist beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP91/00967 beschrieben, auf die hiermit Bezug genommen wird. Dort werden modifizierte Bakterien offenbart, erhältlich durch Transformation eines gram-negativen Bakteriums mit dem Gen eines lytisch wirkenden Membranproteins aus Bakteriophagen, mit dem Gen eines lytisch wirkenden Toxin-Freisetzungsproteins oder mit

Genen, die Teilsequenzen davon, die für lytische Proteine kodieren, enthalten, Kultivierung des Bakteriums, Expression dieses Lyse-Gens und Isolierung des resultierenden Bakterienghosts aus dem Kulturmedium.

An die Membran dieser Bakterien kann, wie im europäischen Patent 0 516 655 beschrieben, ein rekombinantes Protein gebunden sein, das durch Expression einer rekombinanten DNA in diesen gram-negativen Bakterien erhältlich ist. Diese rekombinante DNA umfaßt eine erste DNA-Sequenz, welche für eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne, die eine α-helikale Struktur besitzt und aus 14-20 Aminosäuren besteht, die N- und C-terminal von je 2-30 beliebigen Aminosäuren flankiert sein können, kodiert. Mit dieser ersten DNA-Sequenz in operativer Verknüpfung befindet sich eine zweite DNA-Sequenz, die für ein gewünschtes rekombinantes Protein kodiert. Weiterhin enthält das gram-negative Bakterium eine dritte DNA-Sequenz, die unter einer von den ersten und zweiten DNA-Sequezen getrennten Kontrolle steht und für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen oder ein lytisch wirkendes Toxin-Freisetzungsprotein oder für deren lytisch wirkende Teile kodiert. Durch Expression und Lyse derartiger rekombinanter, gram-negativer Bakterien werden sog. "Bakterienghosts" erhalten, die eine intakte Oberflächenstruktur mit an die Oberfläche gebundenen immunogenen Epitopen enthalten.

Bei Kombination dieser Baktienghosts mit erfindungsgemäßen rekombinanten S-Layern können Vakzine und Adjuvantien erzeugt werden, die besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweisen.

Eine weitere besonders bevorzugte Verwendung für rekombinante S-Layer-Proteine und S-Layer Strukturen ist die Verwendung als Enzymreaktor. Ein solcher Enzymreaktor kann beispielsweise von einer Zelle gebildet werden, die in ihrem Inneren eine erfindungsgemäße rekombinante S-Layer-Struktur enthält. Andererseits kann der Enzymreaktor auch aus isolierten und in vitro

reassemblierten S-Layer-Strukturen oder Kombinationen verschiedender S-Layer-Strukturen gebildet werden.

Es wurde festgestellt, daß das gram-positive Bakterium B.stearothermophilus PV72 neben SbsA noch ein weiteres S-Layer-Protein enthält, das in der Folge als SbsB bezeichnet wird. (Sara und Sleytr (1994), J. Bacteriol. 176, 7182-7189). Durch Amplifikation unter Verwendung geeigneter Nukleinsäureprimer konnte das sbsB-Gen isoliert und charakterisiert werden. In SEQ ID NO.5 ist die kodierende Nukleotidsequenz des S-Layer-Gens sbsB aus B.stearothermophilus einschließlich des Signalpeptid-kodierenden Abschnitts, der von Position 1-93 der Nukleinsäuresequenz reicht, gezeigt. In SEQ ID NO.6 ist die davon abgeleitete Aminosäuresequenz gezeigt. Das sbsB-Gen kodiert für ein Protein mit insgesamt 921 Aminosäuren einschließlich eines N-terminalen Signalpeptids mit 31 Aminosäuren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine Nukleinsäure, die für ein S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus

(i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,

(ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und

(iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

Ebenso wie beim sbsA-Gen kann auch beim sbsB-Gen innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine für ein Peptid oder Polypeptid kodierende Nukleinsäureinsertion eingefügt werden. Bezüglich bevorzugter Beispiele für Insertionen im sbsB-Gen wird auf die zuvor gemachten Ausführungen hinsichtlich des sbsA-Gens verwiesen.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie eines sbsB-Gens gegebenenfalls mit Insertion enthält. Dieser Vektor kann in Eukaryonten, Prokaryonten oder in Eukaryonten und Prokaryonten replizierbar sein. Er kann in ein das Genom der Wirtszelle integrierbarer Vektor oder ein Vektor sein, der extrachromosomal vorliegt. Vorzugsweise ist der erfindungsgemäße Vektor ein Plasmid, insbesondere ein prokaryontisches Plasmid.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einem sbsB-Gen transformiert ist, wobei das sbsB-Gen gegebenenfalls eine Insertion enthalten kann. Die Wirtszelle kann sowohl eine eukaryontische als auch eine prokaryontische Zelle sein. Vorzugsweise ist die Zelle ein prokaryontischer Organismus. Sowohl gram-positive Organismen, z.B. Organismen der Gattung Bacillus, als auch gram-negative Organismen, wie etwa Enterobakterien, insbesondere E.coli, sind bevorzugt. Verfahren zur Transformation von eukaryontischen und prokaryontischen Zellen mit Nukleinsäuren sind bekannt und brauchen daher nicht ausführlich erläutert werden.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein SbsB-Protein, d.h. ein S-Layer-Protein, das von einer Nukleinsäure, wie vorstehend definiert kodiert ist. Besonders bevorzugt sind rekombinante SbsB-Proteine, die eine oder mehrere Peptid- oder/und Polypeptidinsertionen innerhalb der sbsB-Sequenz enthalten. Besonders bevorzugt weist der SbsB-Anteil eines erfindungsgemäßen Polypeptids eine Homologie von mindestens 80% und insbesondere mindestens 90% zu der in SEQ ID NO.6 gezeigten Aminosäuresequenz auf.

Auch aus den rekombinanten SbsB-S-Layer-Proteinmolekülen kann eine rekombinante S-Layer-Struktur entsprechend der rekombinanten SbsA-S-Layer-Struktur assembliert werden. In dieser Struktur liegen die nichtmodifizierten S-Layerproteine vorzugsweise in einem molaren Anteil von 10-99% bezüglich der gesamten S-Layer-Proteine vor.

Auch die Anwendungen der erfindungsgemäßen rekombinanten sbsB-S-Layer-Proteine und S-Layer-Strukturen entsprechen den vorstehend für SbsA genannten Anwendungen. Insbesondere ist dabei die Verwendung als Vakzin oder Adjuvans bzw. als Enzymreaktor bemerkenswert.

Rekombinante S-Layer-Proteine sind erhältlich durch ein Verfahren, bei dem man

(a) eine Wirtszelle bereitstellt, die eine für ein S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure enthält, die innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält,

(b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen,und

(c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle oder dem Kulturmedium gewinnt.

In einer ersten bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens wird ein rekombinantes SbsA-S-Layer-Protein hergestellt, d.h. die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure wird ausgewählt aus

(i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID No.1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,

(ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und

(iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform wird ein rekombinantes SbsB-S-Layer-Protein hergestellt, d.h. die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure wird ausgewählt aus

(i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,

(ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und

(iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

Neben den rekombinanten SbsA und SbsB-S-Layer-Proteinen aus B.stearothermophilus können jedoch auch rekombinante S-Layer-Proteine aus anderen Organismen (vgl. z.B. Peyret et al., (1993), supra) hergestellt werden.

Die Herstellung der rekombinanten S-Layer-Proteine kann einerseits in einer heterologen Wirtszelle erfolgen, d.h. in einer Wirtszelle, die ursprünglich kein S-Layer-Gen enthält. Beispiele für solche heterologen Wirtszellen sind gram-negative prokaryontische Organismen, wie etwa E.coli.

Die heterologe Expression von S-Layer-Proteinen kann jedoch auch in gram-positiven prokaryontischen Organismen, wie etwa B. subtilis, erfolgen. Hierzu werden vorzugsweise Integrationsvektoren verwendet, die ein natives oder/und ein rekombinantes S-Layer-Gen enthalten. Bei Verwendung der nativen Signalsequenzen wird eine Sekretion der S-Layer-Proteine in den Kulturüberstand gebunden.

Oft ist jedoch die Herstellung der rekombinanten S-Layer-Proteine in homologen Wirtszellen bevorzugt, d.h. in Wirtszellen, die ursprünglich ein natürliches S-Layer-Gen enthalten. In einer Ausführungsform dieser homologen Expression wird das rekombinante S-Layer-Gen in die Wirtszelle so eingeführt, daß die Wirtszelle noch in der Lage ist, ein weiteres S-Layer-Gen zu exprimieren, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein

kodiert. Vorzugsweise ist das nichtmodifizierte S-Layer-Protein in der Lage, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden. Ein Beispiel für diese Ausführungsform der homologen Expression ist eine B.stearothermophilus PV72 Zelle, welche intakte natürliche sbsA- oder/und sbsB-Gene enthält, und die mit einem Plasmid transformiert ist, welches ein rekombinantes S-Layer-Gen enthält.

In einer zweiten Ausführungsform kann die homologe Expression in einer Wirtszelle erfolgen, in der das ursprünglich vorhandene intakte S-Layer-Gen inaktiviert wurde. Folglich wird in dieser Ausführungsform in der Wirtszelle kein weiteres S-Layer-Gen mehr exprimiert, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert, welches in der Lage ist, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden. Ein spezifisches Beispiel für eine derartige Wirtszelle ist eine B.stearothermophilus PV72 Zelle, in deren Genom z.B. durch homologe Rekombination ein für ein rekombinantes S-Layer-Protein kodierendes Gen eingeführt wurde, welches das ursprüngliche S-Layer-Gen ersetzt. Ein weiterer Beispiel für eine derartige Wirtszelle ist eine B.stearothermophilus-Zelle, in der das native S-Layer-Gen z.B. durch ortsspezifische Mutagenese oder/und homologe Rekombination inaktiviert wurde und die mit einem ein rekombinantes S-Layer-Gen enthaltenden Vektor transformiert ist.

Bei der homologen Expression rekombinanter S-Layer-Gene werden als Wirtszellen üblicherweise gram-positive prokaryontische Organismen verwendet. Besonders bevorzugt als Wirtszelle ist B.stearothermophilus PV72, der bei hoher Temperatur in einem definierten synthetischen Medium (Schuster et al., (1995), Biotechnol. and Bioeng. 48: 66-77) kultiviert werden kann.

Weiterhin wird die vorliegende Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele und Figuren erläutert. Es zeigen:

SEQ ID NO.1 die vollständige Nukleotidsequenz des kodierenden Abschnitts des S-Layer-Gens sbsA von B.stearothermophilus;

SEQ ID NO.2 die davon abgeleitete Aminosäuresequenz;

SEQ ID NO.3 die Nukleotidsequenz des Primers T5-X;

SEQ ID NO.4 die Nukleotidsequenz des Primers E;

SEQ ID NO.5 die vollständige Nukleotidsequenz des kodierenden Abschnitts des S-Layer-Gens sbsB von B.stearothermophilus;

SEQ ID NO.6 die davon abgeleitete Aminosäuresequenz;

SEQ ID NO.7 die Nukleotidsequenz eines Teilfragments des Streptavidingens;

SEQ ID NO.8 die Nukleotidsequenz des Primers NIS 2AG;

SEQ ID NO.9 die Nukleotidsequenz des Primers LIS C3;

Fig.1 eine schematische Darstellung des zur Herstellung des rekombinanten Vektors pBK4 verwendeten sbsA PCR-Fragments;

Fig.2 eine schematische Darstellung von Peptidinsertionen in die Aminosäuresequenz des SbsA S-Layer-Proteins und

Fig.3 eine schematische Darstellung von Aminosäuresubstitutionen und -insertionen in rekombinanten S-Layer-Proteinen.

BEISPIELE:

1. Bakterienstämme, Medien und Plasmide

Gram-positive Bakterien des Stammes Bacillus stearothermophilus PV72 wurden bei 58°C in SVIII-Medium (Bartelmus und Perschak, Z.Zuckerind.7 (1957), 276-281) kultiviert. Bakterien des Stammes E.coli pop2135 (endA, thi, hsdR, malT, cI857, λpR, malPQ) wurden in LB-Medium kultiviert (Sambrook et al., (1989), supra). Zur Selektion von Transformanten wurde Ampi-

cillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml dem Medium zugegeben. Das Plasmid pPLcAT10 (λpL, bla, colE1) (Stanssens et al., Gene 36 (1985), 211-223) wurde als Klonierungsvektor verwendet.

2. Manipulation von DNA-Fragmenten

Restriktionsanalyse von DNA, Agarosegelelektrophorese und Klonierung von DNA-Fragmenten wurden nach den bei Sambrook et al. (1989), supra, beschriebenen Standardmethoden durchgeführt.

Die Transformation von kompetenten Zellen erfolgte durch Elektroporation unter Verwendung eines Bio-Rad Genepulsers (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalif., USA) nach Protokollen des Herstellers.

Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (Nucleic Acids Res.7 (1979), 1513-1523) isoliert. Chromosomale DNA wurde gemäß der bei Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology (1987), New York, John Wiley) beschriebenen Verfahren isoliert.

Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden von Boehringer Mannheim, New England Biolabs oder Stratagene bezogen und gemäß den Vorschriften der Hersteller eingesetzt.

3. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzen der 5'- und 3'-Regionen (einschließlich des für die Signalsequenz kodierenden Bereichs) des Gens sbsA im Vektor pPLcAT10 wurde nach der Dideoxykettenterminationsmethode von Sanger et al. bestimmt. Die zur Sequenzierung verwendeten Primer wurden auf Basis der bereits publizierten sbsA-Sequenz (Kuen et al., Gene 145 (1994), 115-120) konstruiert.

4. PCR-Amplifikation von sbsA

Die PCR-Amplifikation des sbsA-Gens erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 100 µl, in dem 200 µM Deoxynukleotide, 1U Pfu-Polymerase (Stratagene), 1x Pfu-Reaktionspuffer, jeweils 0.5µM Oligonukleotidprimer und 100 ng genomischer DNA aus B.stearothermophilus als Matrize vorhanden waren. Die Amplifikation wurde über 30 Zyklen in einem Thermocycler (Biomed Thermocycler 60) durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus einem Denaturierungsschritt von 1,5 min bei 95°C, einem Annealingschritt von 1 min bei 56°C und 1 min bei 50°C sowie einem Extensionsschritt von 2 min bei 72°C.

Als Primer wurden der im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO.3 angegebene Primer T5-X, der den 5'-Bereich von sbsA flankiert und eine XbaI-Stelle enthält, sowie der im Sequenzprotokoll in SEQ ID NO.4 gezeigte Primer E verwendet, der die 20 Nukleotide stromabwärts gelegene Region des Transkriptionsterminators der sbsA-Sequenz flankiert und eine BamHI-Stelle enthält.

Die PCR-amplifizierten Produkte wurden auf einem 0.8% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und zur Klonierung unter Verwendung des Systems von Gene Clean (BIO101 La Jolla, Kalif., USA) zur Klonierung gereinigt.

5. Klonierung des sbsA-Gens in den Vektor pPLcAT10

Das durch PCR gewonnene sbsA-Gen mit einer Länge von 3,79 kb wurde gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und BamHI gespalten. Das resultierende XbaI-BamHI-Fragment wurde in die entsprechenden Restriktionsstellen des Vektors pPLcAT10 kloniert, so daß das sbsA-Gen unter transkriptioneller Kontrolle des stromaufwärts gelegenen pL-Promotors war. Das ATG-Startkodon der sbsA-Sequenz wurde durch die Klonierungspozedur rekonstruiert. Die klonierte sbsA-Sequenz enthielt die N-terminale Signalsequenz von sbsA und endete 20 nt nach dem Transkriptionsterminator. Nach Ligation der Vektor-DNA mit dem

sbsA-Fragment wurde der E.coli-Stamm pop2135 durch Elektrotransformation transformiert. Die resultierenden Klone wurden einer DNA-Restriktionsanalyse unterzogen. Ein positiver Klon wurde sequenziert, um die korrekten Sequenzübergänge an den 5'- und 3'-Enden zu verifizieren. Dieser Klon wurde als pBK4 bezeichnet.

Eine schematische Darstellung des 3,79 kb XbaI sbsA-Fragments und seine Lokalisierung in der multiplen Klonierungsstelle des Plasmids pBK4 ist in Fig.1 dargestellt (Abkürzungen: tT: Transkriptionsterminator; ori: Ursprung der DNA-Replikation; amp: Ampicillinresistenzgen).

6. Rekombinante Expression des sbsA-Gens in E.coli

E.coli pop2135/pBK4-Zellen wurden bei 28°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte $OD_{600}$ von 0,3 kultiviert. Dann wurde die Expression von sbsA durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 28°C auf 42°C induziert. 1,5 ml Aliquots wurden vor bzw. 1, 2, 3 und 5 Stunden nach Induktion der sbsA-Expression entnommen. Als Kontrollen wurden E.coli pop2135/pPLcAT10 (kultiviert unter den gleichen Bedingungen) und B.stearothermophilus PV72 verwendet.

Kulturüberstände und Zellextrakte aus allen Proben wurden auf die Expression des S-Layer-Proteins durch SDS-PAGE und Western-Immunoblotting untersucht.

In Extrakten aus mit pBK4 transformierten E.coli-Zellen wurde eine zusätzliche starke Proteinbande mit dem gleichen Molekulargewicht wie das Wildtyp-SbsA-Protein gefunden. Es wurden keine Abbauprodukte von SbsA selbst in einem Zeitraum bis zu 5 Stunden nach der Induktion der Expression gefunden. Dies läßt vermuten, daß das S-Layer-Protein sbsA in E.coli stabil ist und nicht durch Proteasen abgebaut wird.

Es wurde eine densitometrische Bestimmung der relativen Menge an SbsA-Protein durchgeführt. Zu einem Zeitpunkt von 4 Stunden nach der Induktion lag das sbsA-Protein in einem Anteil von ca. 16% bezüglich des gesamten zellulären Proteins vor.

Das in E.coli erzeugte SbsA-Protein wanderte im SDS-Gel etwas langsamer als das natürliche SbsA-Protein aus B.stearothermophilus. Versuche zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz des SbsA-Proteins durch Edman-Abbau schlugen aufgrund einer Blockierung des N-Terminus fehl. Dies läßt vermuten, daß die Signalsequenz in E.coli nicht abgespalten wurde.

Auch eine Western Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen von E.coli/pBK4 ergab nur eine einzige sbsA-spezifische Proteinbande mit einem etwas höheren Molekulargewicht als das Wildtyp-SbsA-Protein aus stearothermophilus.

Für den Western Blot wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyklonalen Antiserum gegen SbsA aus Kaninchen inkubiert. Die Herstellung dieses Antiserums ist bei Egelseer et al. (J.Bacteriol.177 (1995), 1444-1451) beschrieben. Zum Nachweis gebundener SbsA-spezifischer Antikörper wurde ein Konjugat aus Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG und alkalischer Phosphatase verwendet.

Aus Überständen von mit pBK4 transformierten E.coli-Zellen konnte auch nach Induktion der sbsA-Gen-Expression kein SbsA-Protein nachgewiesen werden. Daraus ist ersichtlich, daß SbsA nicht in das umgebende Medium exportiert wird.

7. Lokalisierung und Organisation des S-Layer-Proteins SbsA im Cytoplasma von E.coli

Zellen aus E.coli pop2135/pBK4, die aus Kulturen mit 1, 2, 3 und 5 Stunden nach Induktion der S-Layer-Proteinexpression geerntet wurden, wurden auf die intrazelluläre Organisation von sbsA untersucht. Nichtinduzierte, bei 28°C kultivierte

Zellen und Zellen von B.stearothermophilus PV72 wurden als Kontrollen untersucht.

Hierzu wurden gesamte Zellen beider Organismen fixiert und in Spurrharz nach der Methode von Messner et al. (Int.J.Syst.Bacteriol.34 (1984), 202-210) fixiert und eingebettet. Anschließend wurden ultradünne Schnitte der eingebetteten Präparate hergestellt und mit Uranylacetat angefärbt.

Das Cytoplasma von nichtinduzierten E.coli-Zellen zeigte die typische granuläre Struktur, die sich auch bei einer Zunahme der OD der Suspensionen nicht änderte. Längsschnitte von E.coli-Zellen, die 1 Stunde nach Induktion der S-Layer-Proteinexpression geerntet wurden, zeigten parallele, blattartige Strukturen im Cytoplasma. Aus Querschnitten wurde ersichtlich, daß diese Strukturen eine konzentrische Anordnung zeigten.

Der Anteil blattartiger Strukturen zeigte einen deutlichen Anstieg zwischen 1 und 2 Stunden nach Induktion der sbsA-Expression und blieb danach im wesentlichen konstant.

Das in E.coli rekombinant hergestellte sbsA-Protein konnte auch durch Immunogoldmarkierung mit SbsA-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Auch mit dieser Nachweismethode wurde eine geordnete Struktur des rekombinant hergestellten SbsA-Proteins gefunden.

Aus diesen morphologischen Daten war klar ersichtlich, daß das SbsA-Protein sich nicht zu unregelmäßigen Einschlußkörpern aggregierte, sondern monomolekulare S-Layer-Kristalle bildete. Eine bemerkenswerte Eigenschaft der in E.coli assemblierten SbsA-S-Layer-Schichten war die konzentrische Anordnung in definierten Abständen. Das Vorhandensein der Signalsequenz störte die korrekte Assemblierung nicht.

8. Herstellung von rekombinanten sbsA-S-Layer-Genen

8.1 Insertion einer 6 bp langen DNA-Sequenz

Für die ortsspezifische Insertionsmutagenese des sbsA-Gens wurde eine modifizierte Kanamycinkassette (1,3 kb) verwendet, die durch Spaltung des Plasmids pWJC3 (erhalten von W.T. McAllister, New York) durch SmaI isoliert wurde. Die Kassette wurde in fünf verschiedene glattendige Restriktionsstellen des sbsA-Gens ligiert, nämlich in die NruI-Stelle an Position bp 582 (pSL582), in die SnaBI-Stelle an Position bp 917 (pSL917) und in jede der PvuII-Stellen an Position bp 878 (pSL878), bp 2504 (pSL2504) und bp 2649 (pSL2649). Nach Selektion von Kanamycin-resistenten Klonen wurde die Kassette aus der Insertionsstelle durch Spaltung mit ApaI, gefolgt von einer Religation des S-Layer-Plasmids pBK4, entfernt. Durch die Herausschneide- und Religationsprozedur blieb eine Insertion von 6 bp CCCGGG (ApaI Restriktionsstelle) zurück. Das System dieser Linkerinsertion ist schematisch in Fig.2 dargestellt.

Die resultierenden rekombinanten S-Layer-Gene kodieren für modifizierte, um 2 Aminosäuren verlängerte sbsA-Proteine.

Die konkreten Änderungen in der Primärstruktur der sbsA-Proteine sind in Fig.3 gezeigt. Im Klon pSL582 führte die Insertion zur Einfügung von Glycin und Prolin zwischen den Aminosäuren 194 und 195 am N-Terminus des SbsA-Proteins. Die Aminosäuren Alanin und Arginin wurden im Klon pSL917 zwischen die Aminosäuren 306 und 307 eingefügt. Im Klon pSL2649 wurde eine Insertion von Glycin und Prolin zwischen die Aminosäuren an den Positionen 883 und 884 eingefügt. Eine Insertion von Alanin und Prolin zwischen den Aminosäuren 293 und 294 wurde im Klon pSL878 erhalten. Weiterhin wurde das Alanin an Position 293 durch Glycin ausgetauscht. Im Klon pSL2504 wurden die Aminosäuren Alanin und Prolin zwischen die Aminosäuren 835 und 836 eingeführt und das Alanin an Position 835 durch Glycin ersetzt.

Alle durch Insertionsmutagenese erhaltenen Klone behielten ihre Fähigkeit zur Synthese des S-Layer-Proteins.

Um die Fähigkeit der modifizierten Proteine zur Assemblierung in S-Layer-Strukturen nachzuweisen, wurden gemäß der unter Punkt 7. beschriebenen Prozedur ultradünne Längsschnitte von gesamten Zellen, die 4h unter induktiven Bedingungen kultiviert worden waren, hergestellt. Es wurde gefunden, daß das Cytoplasma aller 5 Klone mit parallelen, blattartigen Strukturen gefüllt ist, welche der Krümmung der Zellpole folgen. Es gab keine morphologischen Unterschiede des Cytoplasma bei den 5 untersuchten verschiedenen Klonen. Es wurden genau die gleichen blattartigen Strukturen wie bei der Assemblierung des Wildtyp-SbsA-Protein in E.coli (Punkt 7.) festgestellt.

8.2 Insertion einer für Streptavidin kodierenden DNA-Sequenz

Um zu untersuchen, ob auch die Insertion größerer Proteinsequenzen in das SbsA-Protein toleriert werden kann, wurde ein mit ApaI-Linkern versehenes, für einen Teil von Streptavidin (160 Aminosäuren) kodierendes DNA-Fragment (SEQ ID No. 7) in die ApaI-Restriktionsstelle der in Beispiel Seite 1 hergestellten sbsA Klone psL582, pSL878, pSL917 und pSL2649 Gen inseriert. Die Insertion der Streptavidinsequenz erfolgte bei SL582 im Codon 197, bei pSL878 zwischen Codon 295 und 296, bei pSL917 zwischen Codon 308 und 309 und bei pSL2649 in Codon 886. Die Expression von SbsA-Streptavidin-Fusionsproteinen konnte bei allen Konstrukten durch SDS-Page und Immunoblots nachgewiesen werden. Durch EM-Analyse wurde festgestellt, daß eine Selbstassemblierung der S-Layerstruktur bei den Fusionsproteinen mit Insertionen im Codon 197 und zwischen den Codons 295 und 296 möglich war.

Die SbsA-Streptavidin-Fusionsproteine können als Monomere isoliert und zu homogenen SbsA-Streptavidin S-Layern oder zu gemischten SbsA-Streptavidin/SbsA-S-Layern reassembliert werden. Sie können zur Bindung biotinylierter Substanzen sowie zur

Bestimmung der Bindekapazität von Enzymen und anderen gebundenen Molekülen eingesetzt werden.

8.3 Insertion einer für BetvI kodierenden DNA-Sequenz

Eine für den offenen Leserahmen von Betv1 (161 Aminosäuren), das Hauptpollenallergen der Birke, kodierende DNA Sequenz (Ferreira et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 19574-19580) wurde an der ApaI-Stelle in den sbsA-Klon pSL878 inseriert. Es konnte die Expression eines SbsA-Betv1-Fusionsproteins nachgewiesen werden, das eine immunologisch aktive Betv1-Domäne enthält.

Das resultierende Fusionsprotein kann für therapeutische oder diagnostische Zwecke eingesetzt werden. So kann durch Verabreichung des Fusionsproteins versucht werden, eine $T_H2$-gerichtete IgE-Antikörperreaktion in eine $T_H1$-vermittelte Reaktion gegen Betv1 umzuwandeln. Auf diese Weise kann das Auftreten der Symptome einer Pollenallergie unterdrückt werden. Weiterhin können SbsA-Betv1 Fusionsproteine zum Test von Anti-Betv1-Antikörperkonzentrationen oder/und zur Verringerung hoher Konzentrationen an Anti-Betv1-IgE verwendet werden.

8.4. Insertion für ein Pseudorabies Virus Antigen kodierender DNA-Sequenz

Es wurde eine Insertion der für das gB Epitop SmaBB (255 Aminosäuren) kodierenden DNA-Sequenz (Nucleotide 489-1224 entsprechend den Koordinaten gemäß EMBL-Seq: HEHSSGP2) von Pseudorabiesvirus in die SSpI-Stelle des sbsA-Gens nach nt 3484 (zwischen Codon 1161 und 1162) durchgeführt. Es konnte die Expression von SbsA-SmaBB Fusionsproteinen nachgewiesen werden.

Die Fusionsproteine können zum Testen gB-spezifischer Immunreaktionen verwendet werden. Eine Westernblot Analyse mit einem monoklonalen Antikörper, welcher der inserierten Sequenz

entspricht, zeigte die immunologische Aktivität der viralen Domäne innerhalb der rekombinanten SbsA-SmaBB Proteine.

8.5 Insertion einer für PHB-Synthase (PhbC) von Alcaligenes eutrophus H16 kodierenden DNA-Sequenz

Eine regelmäßige Anordnung von Polypeptidstrukturen mit enzymatischer Aktivität an der Oberfläche von S-Layern ist ein wichtiges Ziel zur Herstellung immobilisierter Enzyme innerhalb einer lebenden Zelle und im Falle der 590 Aminosäuren langen PHB Synthase zur Herstellung einer molekularen Maschine für eine Biopolymersynthese.

Das phbC Gen wurde durch PCR aus dem Plasmid p4A (Janes et al., Molecular characterisation of the poly-β-hydroxy-butyrate biosynthesis in Alcaligenes eutrophus H16. In: Novel Biodegradable Microbial Polymers (HRSG. Daves, E. A.), pp 175-190 (1990), Kluver, Dordrecht) als 1770 nt langes DNA-Fragment (entsprechend einem offenen Leserahmen von 590 Aminosäuren) isoliert und in die ApaI-Schnittstelle des sbsA-Klons pSL878 inseriert, wobei das Plasmid pSbsA-PhbC erhalten wurde. In einer mit diesem Plasmid transformierten E.coli Zelle konnte die Expression eines SbsA-PhbC-Fusionsproteins mit ca. 195 kD nachgewiesen werden. Bei Insertion von 2 Kopien des phbC-Gens hintereinander in die ApaI-Stelle von pSL878 konnte die Expression eines Fusionsproteins mit ca. 260 kD nachgewiesen werden.

Für einen funktionellen Test der enzymatischen Aktivität des SbsA-PhbC Konstrukts wurden die E.coli Zellen, die das Plasmid pSbsA-PhbC enthielten, mit dem Plasmid pUMS cotransformiert, welches die β-Ketothiolase (PhbA) und die Acetoacetyl-CoA-Reduktase (PhbB) von A. eutrophus (Kalousek et al., Genetic engineering of PHB-synthase from Alcaligenes eutrophus H16. In: Proceedings of the International Symposium on Bacterial Polyhydroxy-alkanoates, pp 426-427 (1993), HRSG. Schlegel H. G., Steinbüchel A. Goltze Druck, Göttingen) enthält. Die Poly-

β-hydroxybutyrat-Bildung in den cotransformierten E.coli Zellen konnte durch Anfärbung mit Sudanschwarz, Gaschromatographie und Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Diese Befunde zeigen, daß das SbsA-PhbC-Konstrukt enzymatisch aktiv ist und erfolgreiches Beispiel zur Immobilisierung von Enzymen auf intrazellulären S-Layer-Matrizen darstellt.

8.6 Insertion einer für ein bakterielles Luciferasegen codierenden DNA-Sequenz

Ein monocistronisches LuxAB Gen mit einer Länge von 2.070 nt, welches ein aus den beiden Untereinheiten LuxB und LuxB der bakteriellen Luciferase aus Vibrio harveyi bestehendes Fusionsprotein LuxAB enthält, wurde aus dem Plasmid pT7-mut3 (Boylan et al., J. Biol. Chem. 264 (1989), 1915-1918) durch PCR isoliert und in die ApaI Stelle des in Beispiel 8.1 hergestellten Klons pSL878 inseriert, wobei das Plasmid pBK878-LuxAB erhalten wurde. In einer mit diesem Plasmid transformierten E.coli Zelle konnte die Expression eines SbsA-PhbC Fusionsproteins mit ca. 207 kD nachgewiesen werden. Die enzymatische Aktivität des Fusionsproteins wurde durch die bei Boylan et al., Supra, beschriebene Methode gezeigt.

9. Isolierung und Charakterisierung des sbsB-Gens

Als Grundlage für die Isolierung des sbsB-Gens diente die Aminosäuresequenz des N-Terminus sowie die Sequenz von drei internen Peptiden des SbsB-Proteins. Von diesen Peptidsequenzen ausgehend wurden degenerierte Oligonukleotidprimer konstruiert und für die PCR eingesetzt. Auf diese Weise wurde ein 1076 bp langes PCR-Fragment aus der chromosomalen DNA von B.stearothermophilus amplifiziert, kloniert und sequenziert (entsprechend Position 100-1176 der in SEQ ID NO.5 gezeigten Sequenz).

Für die Amplifikation der 5'- und 3'-seitigen Abschnitte des sbsB-Gens wurde die Methode der inversen PCR angewendet und

mit Hilfe verschiedener Primerkombinationen schrittweise überlappende DNA-Fragmente erhalten und sequenziert.

Zur Amplifizierung des vollständigen sbsB-Gens wurden als Primer der im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO.8 angegebene Primer NIS 2AG, der den 5'-Bereich von sbsB enthält, sowie der im Sequenzprotokoll in SEQ ID NO.9 angegebene Primer LIS C3 verwendet, der den 3'-Bereich von sbsB enthält.

Das auf diese Weise erhaltene PCR-Fragment, welches die in SEQ ID NO.5 gezeigte Nukleotidsequenz mit 5'- und 3'-BamHI-Restriktionsschnittstellen enthält, wurde wie im Beispiel 5 beschrieben in den Vektor pPLcAT10 kloniert, in dem die Expression unter Kontrolle des Lambda PL-Promotors erfolgte.

Weiterhin wurde das sbsB-PCR-Fragment mit 5'seitiger EcoRI- und 3'seitiger BamHI-Schnittstelle in den Vektor pUC18 kloniert, in dem die Expression unter Kontrolle des lac-Promotors erfolgte.

Der Nachweis der sbsB-Expression erfolgte wie in den Beispielen 6 und 7 beschrieben durch SDS-Gelelektrophorese und Elektronenmikroskopie.

10. Herstellung von rekombinanten sbsB-S-Layer-Genen

Analog der in Beispiel 8 beschriebenen Methoden wurden rekombinante sbsB Gene hergestellt.

So wurde gemäß der in Beispiel 8.1 beschriebenen Methode eine 6 nt lange, eine ApaI-Restriktionsschnittstelle enthaltende DNA-Sequenz an verschiedenen Positionen in das sbsB-Layer-Gen eingeführt. Auf diese Weise wurden die rekombinanten sbsB Klone pAK407, pAK481 und pAK1582 mit ApaI-Schnittstellen bei nt 407 (Codon 136), 481 (Codon 161/162) und 1582 (Codon 528/529) erhalten. Diese durch Insertionsmutagene erhaltenen

Klone behielten ihre Fähigkeit zur Synthese des S-Layerproteins und zur Ausbildung von S-Layerstrukturen.

Analog der in Beispiel 8.2 beschriebenen Methode wurde ein für Streptavidin kodierendes DNA-Fragment in die ApaI-Restriktionsstellen der sbsB-Klone pAK407 bzw. pAK481 eingeführt.

Analog Beispiel 8.4 wurde eine für das gB-Epitop SmaBB codierende DNA-Sequenz in die ApaI-Schnittstellen der sbsB Klone pAK481 und pAK1582 eingeführt. In den mit den resultierenden rekombinanten Plasmiden transformierten E.coli Zellen konnte die Expression von sbsB-SmaB Fusionsproteinen mit ca. 130 kD nachgewiesen werden. Bei Insertion von zwei Kopien des SmaBB Epitops hintereinander in die ApaI-Schnittstelle von pAK481 konnte die Expression eines Fusionproteins mit ca. 157 kD nachgewiesen werden. Die SmaBB Domänen der Fusionsproteine wurden von spezifischen Antikörpern erkannt.

Analog zu Beispiel 8.6 konnte bei Insertion der LuxAB Sequenz in die ApaI-Schnittstelle von pAK407 die Expression eines 175 kD SbsB-LuxAB Fusionproteins nachgewiesen werden.

11. Hereologe Expression von sbsA und sbsB in Bacillus subtilis

Zur heterologen Expression von sbsA und sbsB in B. subtilis wurde der Integrationsvektor pX (Kim, L., Mogk, A. und Schumann W., Gene 181 (1996), 71-76: A xylose-inducible Bacillus subtilis integration vector and its application) verwendet. In den resultierenden rekombinanten Expressionsvektoren befinden sich die S-Layer Gene unter der transkriptionellen Kontrolle des xyl Promotors. Transformanten von B. subtilis mit einem im Chromosom integrierten S-Layergen zeigten eine durch Zugabe von Xylose zum Wachstumsmedium induzierbare Expression von großen Mengen an S-Layerproteinen im Überstand der Zellen. Dies zeigt, daß die Signalsequenzen von sbsA und sbsB von der B. subtilis Zelle erkannt werden.

Auf analoge Weise konnte eine heterologe Expression rekombinanter sbsA und sbsB Layergene in B. subtilis erreicht werden.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME: Werner Lubitz
(B) STRASSE: Schoenborngasse 12/7
(C) ORT: Wien
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 1080

(A) NAME: Uwe Sleytr
(B) STRASSE: Parhamerplatz 10
(C) ORT: Wien
(E) LAND: Austria
(F) POSTLEITZAHL: 1170

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinante Expression von S-Layer-Proteinen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 3687 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: beides
(D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Bacillus stearothermophilus
(B) STAMM: PV72

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
(B) CLON(E): sbsA

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:1..3684

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
(B) LAGE:1..90

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE:91..3684

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
ATG GAT AGG AAA AAA GCT GTG AAA CTA GCA ACA GCA AGT GCT ATT GCA          48
Met Asp Arg Lys Lys Ala Val Lys Leu Ala Thr Ala Ser Ala Ile Ala
-30                 -25                 -20                 -15

GCA AGT GCA TTT GTC GCT GCA AAT CCA AAC GCT TCT GAA GCG GCT ACA          96
Ala Ser Ala Phe Val Ala Ala Asn Pro Asn Ala Ser Glu Ala Ala Thr
                -10                 -5                  1

GAT GTA GCA ACA GTA GTA AGC CAA GCA AAA GCA CAG TTC AAA AAA GCA         144
Asp Val Ala Thr Val Val Ser Gln Ala Lys Ala Gln Phe Lys Lys Ala
          5                  10                  15

TAC TAT ACT TAC AGC CAT ACA GTA ACG GAA ACT GGT GAA TTC CCA AAC         192
Tyr Tyr Thr Tyr Ser His Thr Val Thr Glu Thr Gly Glu Phe Pro Asn
     20                  25                  30

ATT AAC GAT GTA TAT GCT GAA TAC AAC AAA GCG AAA AAA CGA TAC CGT         240
Ile Asn Asp Val Tyr Ala Glu Tyr Asn Lys Ala Lys Lys Arg Tyr Arg
 35                  40                  45                  50

GAT GCG GTA GCA TTA GTG AAT AAA GCA GGT GGC GCG AAA AAA GAC GCT         288
Asp Ala Val Ala Leu Val Asn Lys Ala Gly Gly Ala Lys Lys Asp Ala
                55                  60                  65

TAC TTA GCT GAT TTA CAA AAA GAA TAT GAA ACT TAC GTT TTC AAA GCA         336
Tyr Leu Ala Asp Leu Gln Lys Glu Tyr Glu Thr Tyr Val Phe Lys Ala
            70                  75                  80

AAC CCT AAA TCT GGC GAA GCT CGT GTA GCA ACT TAC ATC GAT GCT TAC         384
Asn Pro Lys Ser Gly Glu Ala Arg Val Ala Thr Tyr Ile Asp Ala Tyr
          85                  90                  95

AAC TAT GCA ACA AAA TTA GAC GAA ATG CGC CAA GAG CTA GAG GCT GCT         432
Asn Tyr Ala Thr Lys Leu Asp Glu Met Arg Gln Glu Leu Glu Ala Ala
     100                 105                 110

GTT CAA GCA AAA GAT TTA GAA AAA GCA GAA CAA TAC TAT CAC AAA ATT         480
Val Gln Ala Lys Asp Leu Glu Lys Ala Glu Gln Tyr Tyr His Lys Ile
115                 120                 125                 130

CCT TAT GAA ATT AAA ACT CGC ACA GTC ATT TTA GAT CGC GTA TAT GGT         528
Pro Tyr Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ile Leu Asp Arg Val Tyr Gly
                135                 140                 145

AAA ACA ACT CGT GAT TTA CTT CGC TCT ACA TTT AAA GCA AAA GCA CAA         576
Lys Thr Thr Arg Asp Leu Leu Arg Ser Thr Phe Lys Ala Lys Ala Gln
            150                 155                 160

GAA CTT CGC GAC AGC TTA ATT TAT GAT ATT ACC GTT GCA ATG AAA GCG         624
Glu Leu Arg Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Ile Thr Val Ala Met Lys Ala
        165                 170                 175
```

```
CGC GAA GTA CAA GAC GCT GTG AAA GCA GGC AAT TTA GAC AAA GCT AAA          672
Arg Glu Val Gln Asp Ala Val Lys Ala Gly Asn Leu Asp Lys Ala Lys
    180                 185                 190

GCT GCT GTT GAT CAA ATC AAT CAA TAC TTA CCA AAA GTA ACA GAT GCT          720
Ala Ala Val Asp Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Pro Lys Val Thr Asp Ala
195                 200                 205                 210

TTC AAA ACT GAA CTA ACA GAA GTA GCG AAA AAA GCA TTA GAT GCA GAT          768
Phe Lys Thr Glu Leu Thr Glu Val Ala Lys Lys Ala Leu Asp Ala Asp
                215                 220                 225

GAA GCT GCG CTT ACT CCA AAA GTT GAA AGT GTA AGT GCG ATT AAC ACT          816
Glu Ala Ala Leu Thr Pro Lys Val Glu Ser Val Ser Ala Ile Asn Thr
            230                 235                 240

CAA AAC AAA GCT GTT GAA TTA ACA GCA GTA CCA GTG AAC GGA ACA CTA          864
Gln Asn Lys Ala Val Glu Leu Thr Ala Val Pro Val Asn Gly Thr Leu
        245                 250                 255

AAA TTA CAA CTT TCA GCT GCT GCA AAT GAA GAT ACA GTA AAC GTA AAT          912
Lys Leu Gln Leu Ser Ala Ala Ala Asn Glu Asp Thr Val Asn Val Asn
    260                 265                 270

ACT GTA CGT ATC TAT AAA GTG GAC GGT AAC ATT CCA TTT GCC CTT AAT          960
Thr Val Arg Ile Tyr Lys Val Asp Gly Asn Ile Pro Phe Ala Leu Asn
275                 280                 285                 290

ACG GCA GAT GTT TCT TTA TCT ACA GAC GGA AAA ACT ATC ACT GTG GAT         1008
Thr Ala Asp Val Ser Leu Ser Thr Asp Gly Lys Thr Ile Thr Val Asp
                295                 300                 305

GCT TCA ACT CCA TTC GAA AAT AAT ACG GAG TAT AAA GTA GTA GTT AAA         1056
Ala Ser Thr Pro Phe Glu Asn Asn Thr Glu Tyr Lys Val Val Val Lys
            310                 315                 320

GGT ATT AAA GAC AAA AAT GGC AAA GAA TTT AAA GAA GAT GCA TTC ACT         1104
Gly Ile Lys Asp Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Glu Asp Ala Phe Thr
        325                 330                 335

TTC AAG CTT CGA AAT GAT GCT GTA GTT ACT CAA GTG TTT GGA ACT AAT         1152
Phe Lys Leu Arg Asn Asp Ala Val Val Thr Gln Val Phe Gly Thr Asn
    340                 345                 350

GTA ACA AAC AAC ACT TCT GTA AAC TTA GCA GCA GGT ACT TTC GAC ACT         1200
Val Thr Asn Asn Thr Ser Val Asn Leu Ala Ala Gly Thr Phe Asp Thr
355                 360                 365                 370

GAC GAT ACT TTA ACA GTA GTA TTT GAT AAG TTG TTA GCA CCT GAA ACT         1248
Asp Asp Thr Leu Thr Val Val Phe Asp Lys Leu Leu Ala Pro Glu Thr
                375                 380                 385

GTA AAC AGC TCG AAC GTT ACT ATT ACA GAT GTT GAA ACT GGA AAA CGC         1296
Val Asn Ser Ser Asn Val Thr Ile Thr Asp Val Glu Thr Gly Lys Arg
            390                 395                 400

ATT CCA GTA ATT GCA TCT ACT TCT GGT TCT ACA ATT ACT ATT ACG TTA         1344
Ile Pro Val Ile Ala Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ile Thr Ile Thr Leu
        405                 410                 415

AAA GAA GCG TTA GTA ACT GGT AAA CAA TAT AAA CTT GCT ATC AAT AAT         1392
Lys Glu Ala Leu Val Thr Gly Lys Gln Tyr Lys Leu Ala Ile Asn Asn
    420                 425                 430

GTT AAA ACA TTA ACT GGT TAC AAT GCA GAA GCT TAC GAG TTA GTG TTC         1440
Val Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Asn Ala Glu Ala Tyr Glu Leu Val Phe
435                 440                 445                 450
```

```
ACT GCA AAC GCA TCA GCA CCA ACT GTT GCT ACC GCT CCT ACT ACT TTA      1488
Thr Ala Asn Ala Ser Ala Pro Thr Val Ala Thr Ala Pro Thr Thr Leu
                455                 460                 465

GGT GGT ACA ACT TTA TCT ACT GGT TCT CTT ACA ACA AAT GTT TGG GGT      1536
Gly Gly Thr Thr Leu Ser Thr Gly Ser Leu Thr Thr Asn Val Trp Gly
            470                 475                 480

AAA TTG GCT GGT GGT GTG AAT GAA GCT GGA ACT TAT TAT CCT GGT CTT      1584
Lys Leu Ala Gly Gly Val Asn Glu Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Gly Leu
        485                 490                 495

CAA TTC ACA ACA ACG TTT GCT ACT AAG TTA GAC GAA TCT ACT TTA GCT      1632
Gln Phe Thr Thr Thr Phe Ala Thr Lys Leu Asp Glu Ser Thr Leu Ala
    500                 505                 510

GAT AAC TTT GTA TTA GTT GAA AAA GAA TCT GGT ACA GTT GTT GCT TCT      1680
Asp Asn Phe Val Leu Val Glu Lys Glu Ser Gly Thr Val Val Ala Ser
515                 520                 525                 530

GAA CTA AAA TAT AAT GCA GAC GCT AAA ATG GTA ACT TTA GTG CCA AAA      1728
Glu Leu Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Lys Met Val Thr Leu Val Pro Lys
                535                 540                 545

GCG GAC CTT AAA GAA AAT ACA ATC TAT CAA ATC AAA ATT AAA AAA GGC      1776
Ala Asp Leu Lys Glu Asn Thr Ile Tyr Gln Ile Lys Ile Lys Lys Gly
            550                 555                 560

TTG AAG TCC GAT AAA GGT ATT GAA TTA GGC ACT GTT AAC GAG AAA ACA      1824
Leu Lys Ser Asp Lys Gly Ile Glu Leu Gly Thr Val Asn Glu Lys Thr
        565                 570                 575

TAT GAG TTC AAA ACT CAA GAC TTA ACT GCT CCT ACA GTT ATT AGC GTA      1872
Tyr Glu Phe Lys Thr Gln Asp Leu Thr Ala Pro Thr Val Ile Ser Val
    580                 585                 590

ACG TCT AAA AAT GGC GAC GCT GGA TTA AAA GTA ACT GAA GCT CAA GAA      1920
Thr Ser Lys Asn Gly Asp Ala Gly Leu Lys Val Thr Glu Ala Gln Glu
595                 600                 605                 610

TTT ACT GTG AAG TTC TCA GAG AAT TTA AAT ACA TTT AAT GCT ACA ACC      1968
Phe Thr Val Lys Phe Ser Glu Asn Leu Asn Thr Phe Asn Ala Thr Thr
                615                 620                 625

GTT TCG GGT AGC ACA ATC ACA TAC GGT CAA GTT GCT GTA GTA AAA GCG      2016
Val Ser Gly Ser Thr Ile Thr Tyr Gly Gln Val Ala Val Val Lys Ala
            630                 635                 640

GGT GCA AAC TTA TCT GCT CTT ACA GCA AGT GAC ATC ATT CCA GCT AGT      2064
Gly Ala Asn Leu Ser Ala Leu Thr Ala Ser Asp Ile Ile Pro Ala Ser
        645                 650                 655

GTT GAA GCG GTT ACT GGT CAA GAT GGA ACA TAC AAA GTG AAA GTT GCT      2112
Val Glu Ala Val Thr Gly Gln Asp Gly Thr Tyr Lys Val Lys Val Ala
    660                 665                 670

GCT AAC CAA TTA GAA CGT AAC CAA GGG TAC AAA TTA GTA GTG TTC GGT      2160
Ala Asn Gln Leu Glu Arg Asn Gln Gly Tyr Lys Leu Val Val Phe Gly
675                 680                 685                 690

AAA GGT GCA ACA GCT CCT GTT AAA GAT GCT GCA AAT GCA AAT ACT TTA      2208
Lys Gly Ala Thr Ala Pro Val Lys Asp Ala Ala Asn Ala Asn Thr Leu
                695                 700                 705

GCA ACT AAC TAT ATC TAT ACA TTT ACA ACT GAA GGT CAA GAC GTA ACA      2256
Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Thr Phe Thr Thr Glu Gly Gln Asp Val Thr
            710                 715                 720
```

```
GCA CCA ACG GTT ACA AAA GTA TTC AAA GGT GAT TCT TTA AAA GAC GCT      2304
Ala Pro Thr Val Thr Lys Val Phe Lys Gly Asp Ser Leu Lys Asp Ala
        725                 730                 735

GAT GCA GTT ACT ACA CTT ACG AAC GTT GAT GCA GGT CAA AAA TTC ACT      2352
Asp Ala Val Thr Thr Leu Thr Asn Val Asp Ala Gly Gln Lys Phe Thr
    740                 745                 750

ATC CAA TTT AGC GAA GAA TTA AAA ACT TCT AGT GGT TCT TTA GTG GGT      2400
Ile Gln Phe Ser Glu Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gly
755                 760                 765                 770

GGC AAA GTA ACT GTC GAG AAA TTA ACA AAC AAC GGA TGG GTA GAT GCT      2448
Gly Lys Val Thr Val Glu Lys Leu Thr Asn Asn Gly Trp Val Asp Ala
                775                 780                 785

GGT ACT GGA ACA ACT GTA TCA GTT GCT CCT AAG ACA GAT GCA AAT GGT      2496
Gly Thr Gly Thr Thr Val Ser Val Ala Pro Lys Thr Asp Ala Asn Gly
            790                 795                 800

AAA GTA ACA GCT GCT GTG GTT ACA TTA ACT GGT CTT GAC AAT AAC GAC      2544
Lys Val Thr Ala Ala Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Asp Asn Asn Asp
        805                 810                 815

AAA GAT GCG AAA TTG CGT CTG GTA GTA GAT AAG TCT TCT ACT GAT GGA      2592
Lys Asp Ala Lys Leu Arg Leu Val Val Asp Lys Ser Ser Thr Asp Gly
    820                 825                 830

ATT GCT GAT GTA GCT GGT AAT GTA ATT AAG GAA AAA GAT ATT TTA ATT      2640
Ile Ala Asp Val Ala Gly Asn Val Ile Lys Glu Lys Asp Ile Leu Ile
835                 840                 845                 850

CGT TAC AAC AGC TGG AGA CAC ACT GTA GCT TCT GTG AAA GCT GCT GCT      2688
Arg Tyr Asn Ser Trp Arg His Thr Val Ala Ser Val Lys Ala Ala Ala
                855                 860                 865

GAC AAA GAT GGT CAA AAC GCT TCT GCT GCA TTC CCA ACA AGC ACT GCA      2736
Asp Lys Asp Gly Gln Asn Ala Ser Ala Ala Phe Pro Thr Ser Thr Ala
            870                 875                 880

ATT GAT ACA ACT AAG AGC TTA TTA GTT GAA TTC AAT GAA ACT GAT TTA      2784
Ile Asp Thr Thr Lys Ser Leu Leu Val Glu Phe Asn Glu Thr Asp Leu
        885                 890                 895

GCG GAA GTT AAA CCT GAG AAC ATC GTT GTT AAA GAT GCA GCA GGT AAT      2832
Ala Glu Val Lys Pro Glu Asn Ile Val Val Lys Asp Ala Ala Gly Asn
    900                 905                 910

GCG GTA GCT GGT ACT GTA ACA GCA TTA GAC GGT TCT ACA AAT AAA TTT      2880
Ala Val Ala Gly Thr Val Thr Ala Leu Asp Gly Ser Thr Asn Lys Phe
915                 920                 925                 930

GTA TTC ACT CCA TCT CAA GAA TTA AAA GCT GGT ACA GTT TAC TCT GTA      2928
Val Phe Thr Pro Ser Gln Glu Leu Lys Ala Gly Thr Val Tyr Ser Val
                935                 940                 945

ACA ATT GAC GGT GTG AGA GAT AAA GTA GGT AAC ACA ATC TCT AAA TAC      2976
Thr Ile Asp Gly Val Arg Asp Lys Val Gly Asn Thr Ile Ser Lys Tyr
            950                 955                 960

ATT ACT TCG TTC AAG ACT GTA TCT GCG AAT CCA ACG TTA TCT TCA ATC      3024
Ile Thr Ser Phe Lys Thr Val Ser Ala Asn Pro Thr Leu Ser Ser Ile
        965                 970                 975

AGC ATT GCT GAC GGT GCA GTT AAC GTT GAC CGT TCT AAA ACA ATT ACA      3072
Ser Ile Ala Asp Gly Ala Val Asn Val Asp Arg Ser Lys Thr Ile Thr
    980                 985                 990
```

```
ATT GAA TTC AGC GAT TCA GTT CCA AAC CCA ACA ATC ACT CTT AAG AAG      3120
Ile Glu Phe Ser Asp Ser Val Pro Asn Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys
995                 1000                1005                1010

GCT GAC GGA ACT TCA TTT ACT AAT TAC ACT TTA GTA AAT GTA AAT AAT      3168
Ala Asp Gly Thr Ser Phe Thr Asn Tyr Thr Leu Val Asn Val Asn Asn
                1015                1020                1025

GAA AAT AAA ACA TAC AAA ATT GTA TTC CAC AAA GGT GTA ACA CTT GAC      3216
Glu Asn Lys Thr Tyr Lys Ile Val Phe His Lys Gly Val Thr Leu Asp
            1030                1035                1040

GAG TTT ACT CAA TAT GAG TTA GCA GTT TCA AAA GAT TTT CAA ACT GGT      3264
Glu Phe Thr Gln Tyr Glu Leu Ala Val Ser Lys Asp Phe Gln Thr Gly
        1045                1050                1055

ACT GAT ATT GAT AGC AAA GTT ACA TTC ATC ACA GGT TCT GTT GCT ACT      3312
Thr Asp Ile Asp Ser Lys Val Thr Phe Ile Thr Gly Ser Val Ala Thr
    1060                1065                1070

GAC GAA GTA AAA CCT GCT CTA GTA GGC GTT GGT TCA TGG AAT GGA ACA      3360
Asp Glu Val Lys Pro Ala Leu Val Gly Val Gly Ser Trp Asn Gly Thr
1075                1080                1085                1090

AGC TAT ACT CAG GAT GCT GCA GCA ACA CGA CTT CGG TCT GTA GCT GAC      3408
Ser Tyr Thr Gln Asp Ala Ala Ala Thr Arg Leu Arg Ser Val Ala Asp
                1095                1100                1105

TTC GTT GCG GAG CCA GTT GCC CTT CAA TTC TCA GAA GGT ATC GAT TTA      3456
Phe Val Ala Glu Pro Val Ala Leu Gln Phe Ser Glu Gly Ile Asp Leu
            1110                1115                1120

ACG AAT GCA ACT GTG ACA GTA ACA AAT ATT ACT GAT GAT AAA ACT GTT      3504
Thr Asn Ala Thr Val Thr Val Thr Asn Ile Thr Asp Asp Lys Thr Val
        1125                1130                1135

GAA GTT ATT TCA AAA GAG AGT GTA GAC GCA GAC CAT GAT GCA GGT GCT      3552
Glu Val Ile Ser Lys Glu Ser Val Asp Ala Asp His Asp Ala Gly Ala
    1140                1145                1150

ACT AAG GAG ACA TTA GTA ATT AAC ACA GTT ACT CCT TTA GTA CTT GAT      3600
Thr Lys Glu Thr Leu Val Ile Asn Thr Val Thr Pro Leu Val Leu Asp
1155                1160                1165                1170

AAC AGC AAG ACT TAT AAG ATT GTT GTA AGT GGA GTT AAA GAT GCA GCA      3648
Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Ile Val Val Ser Gly Val Lys Asp Ala Ala
                1175                1180                1185

GGT AAT GTT GCA GAT ACT ATT ACA TTC TAT ATT AAG TAA                  3687
Gly Asn Val Ala Asp Thr Ile Thr Phe Tyr Ile Lys
            1190                1195
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 1228 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```
Met Asp Arg Lys Lys Ala Val Lys Leu Ala Thr Ala Ser Ala Ile Ala
-30                 -25                 -20                 -15

Ala Ser Ala Phe Val Ala Ala Asn Pro Asn Ala Ser Glu Ala Ala Thr
                -10                 -5                  1

Asp Val Ala Thr Val Val Ser Gln Ala Lys Ala Gln Phe Lys Lys Ala
            5                   10                  15

Tyr Tyr Thr Tyr Ser His Thr Val Thr Glu Thr Gly Glu Phe Pro Asn
        20                  25                  30

Ile Asn Asp Val Tyr Ala Glu Tyr Asn Lys Ala Lys Lys Arg Tyr Arg
    35                  40                  45                  50

Asp Ala Val Ala Leu Val Asn Lys Ala Gly Gly Ala Lys Lys Asp Ala
                55                  60                  65

Tyr Leu Ala Asp Leu Gln Lys Glu Tyr Glu Thr Tyr Val Phe Lys Ala
            70                  75                  80

Asn Pro Lys Ser Gly Glu Ala Arg Val Ala Thr Tyr Ile Asp Ala Tyr
            85                  90                  95

Asn Tyr Ala Thr Lys Leu Asp Glu Met Arg Gln Glu Leu Glu Ala Ala
        100                 105                 110

Val Gln Ala Lys Asp Leu Glu Lys Ala Glu Gln Tyr Tyr His Lys Ile
    115                 120                 125                 130

Pro Tyr Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ile Leu Asp Arg Val Tyr Gly
                135                 140                 145

Lys Thr Thr Arg Asp Leu Leu Arg Ser Thr Phe Lys Ala Lys Ala Gln
            150                 155                 160

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

Arg Glu Val Gln Asp Ala Val Lys Ala Gly Asn Leu Asp Lys Ala Lys
    180                 185                 190

Ala Ala Val Asp Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Pro Lys Val Thr Asp Ala
195                 200                 205                 210

Phe Lys Thr Glu Leu Thr Glu Val Ala Lys Lys Ala Leu Asp Ala Asp
                215                 220                 225

Glu Ala Ala Leu Thr Pro Lys Val Glu Ser Val Ser Ala Ile Asn Thr
            230                 235                 240

Gln Asn Lys Ala Val Glu Leu Thr Ala Val Pro Val Asn Gly Thr Leu
        245                 250                 255

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

Thr Val Arg Ile Tyr Lys Val Asp Gly Asn Ile Pro Phe Ala Leu Asn
275                 280                 285                 290

Thr Ala Asp Val Ser Leu Ser Thr Asp Gly Lys Thr Ile Thr Val Asp
                295                 300                 305

Ala Ser Thr Pro Phe Glu Asn Asn Thr Glu Tyr Lys Val Val Val Lys
            310                 315                 320
```

Gly Ile Lys Asp Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Glu Asp Ala Phe Thr
325 330 335

Phe Lys Leu Arg Asn Asp Ala Val Val Thr Gln Val Phe Gly Thr Asn
340 345 350

Val Thr Asn Asn Thr Ser Val Asn Leu Ala Ala Gly Thr Phe Asp Thr
355 360 365 370

Asp Asp Thr Leu Thr Val Val Phe Asp Lys Leu Leu Ala Pro Glu Thr
375 380 385

Val Asn Ser Ser Asn Val Thr Ile Thr Asp Val Glu Thr Gly Lys Arg
390 395 400

Ile Pro Val Ile Ala Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ile Thr Ile Thr Leu
405 410 415

Lys Glu Ala Leu Val Thr Gly Lys Gln Tyr Lys Leu Ala Ile Asn Asn
420 425 430

Val Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Asn Ala Glu Ala Tyr Glu Leu Val Phe
435 440 445 450

Thr Ala Asn Ala Ser Ala Pro Thr Val Ala Thr Ala Pro Thr Thr Leu
455 460 465

Gly Gly Thr Thr Leu Ser Thr Gly Ser Leu Thr Thr Asn Val Trp Gly
470 475 480

Lys Leu Ala Gly Gly Val Asn Glu Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Gly Leu
485 490 495

Gln Phe Thr Thr Thr Phe Ala Thr Lys Leu Asp Glu Ser Thr Leu Ala
500 505 510

Asp Asn Phe Val Leu Val Glu Lys Glu Ser Gly Thr Val Val Ala Ser
515 520 525 530

Glu Leu Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Lys Met Val Thr Leu Val Pro Lys
535 540 545

Ala Asp Leu Lys Glu Asn Thr Ile Tyr Gln Ile Lys Ile Lys Lys Gly
550 555 560

Leu Lys Ser Asp Lys Gly Ile Glu Leu Gly Thr Val Asn Glu Lys Thr
565 570 575

Tyr Glu Phe Lys Thr Gln Asp Leu Thr Ala Pro Thr Val Ile Ser Val
580 585 590

Thr Ser Lys Asn Gly Asp Ala Gly Leu Lys Val Thr Glu Ala Gln Glu
595 600 605 610

Phe Thr Val Lys Phe Ser Glu Asn Leu Asn Thr Phe Asn Ala Thr Thr
615 620 625

Val Ser Gly Ser Thr Ile Thr Tyr Gly Gln Val Ala Val Val Lys Ala
630 635 640

Gly Ala Asn Leu Ser Ala Leu Thr Ala Ser Asp Ile Ile Pro Ala Ser
645 650 655

Val Glu Ala Val Thr Gly Gln Asp Gly Thr Tyr Lys Val Lys Val Ala
660 665 670

Ala Asn Gln Leu Glu Arg Asn Gln Gly Tyr Lys Leu Val Val Phe Gly
675 680 685 690

Lys Gly Ala Thr Ala Pro Val Lys Asp Ala Ala Asn Ala Asn Thr Leu
695 700 705

Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Thr Phe Thr Thr Glu Gly Gln Asp Val Thr
710 715 720

Ala Pro Thr Val Thr Lys Val Phe Lys Gly Asp Ser Leu Lys Asp Ala
725 730 735

Asp Ala Val Thr Thr Leu Thr Asn Val Asp Ala Gly Gln Lys Phe Thr
740 745 750

Ile Gln Phe Ser Glu Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gly
755 760 765 770

Gly Lys Val Thr Val Glu Lys Leu Thr Asn Asn Gly Trp Val Asp Ala
775 780 785

Gly Thr Gly Thr Thr Val Ser Val Ala Pro Lys Thr Asp Ala Asn Gly
790 795 800

Lys Val Thr Ala Ala Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Asp Asn Asn Asp
805 810 815

Lys Asp Ala Lys Leu Arg Leu Val Val Asp Lys Ser Ser Thr Asp Gly
820 825 830

Ile Ala Asp Val Ala Gly Asn Val Ile Lys Glu Lys Asp Ile Leu Ile
835 840 845 850

Arg Tyr Asn Ser Trp Arg His Thr Val Ala Ser Val Lys Ala Ala Ala
855 860 865

Asp Lys Asp Gly Gln Asn Ala Ser Ala Ala Phe Pro Thr Ser Thr Ala
870 875 880

Ile Asp Thr Thr Lys Ser Leu Leu Val Glu Phe Asn Glu Thr Asp Leu
885 890 895

Ala Glu Val Lys Pro Glu Asn Ile Val Val Lys Asp Ala Ala Gly Asn
900 905 910

Ala Val Ala Gly Thr Val Thr Ala Leu Asp Gly Ser Thr Asn Lys Phe
915 920 925 930

Val Phe Thr Pro Ser Gln Glu Leu Lys Ala Gly Thr Val Tyr Ser Val
935 940 945

Thr Ile Asp Gly Val Arg Asp Lys Val Gly Asn Thr Ile Ser Lys Tyr
950 955 960

Ile Thr Ser Phe Lys Thr Val Ser Ala Asn Pro Thr Leu Ser Ser Ile
965 970 975

Ser Ile Ala Asp Gly Ala Val Asn Val Asp Arg Ser Lys Thr Ile Thr
980 985 990

Ile Glu Phe Ser Asp Ser Val Pro Asn Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys
995 1000 1005 1010

Ala Asp Gly Thr Ser Phe Thr Asn Tyr Thr Leu Val Asn Val Asn Asn
1015 1020 1025

Glu Asn Lys Thr Tyr Lys Ile Val Phe His Lys Gly Val Thr Leu Asp
1030 1035 1040

Glu Phe Thr Gln Tyr Glu Leu Ala Val Ser Lys Asp Phe Gln Thr Gly
1045 1050 1055

Thr Asp Ile Asp Ser Lys Val Thr Phe Ile Thr Gly Ser Val Ala Thr
1060 1065 1070

Asp Glu Val Lys Pro Ala Leu Val Gly Val Gly Ser Trp Asn Gly Thr
1075 1080 1085 1090

Ser Tyr Thr Gln Asp Ala Ala Ala Thr Arg Leu Arg Ser Val Ala Asp
1095 1100 1105

Phe Val Ala Glu Pro Val Ala Leu Gln Phe Ser Glu Gly Ile Asp Leu
1110 1115 1120

Thr Asn Ala Thr Val Thr Val Thr Asn Ile Thr Asp Asp Lys Thr Val
1125 1130 1135

Glu Val Ile Ser Lys Glu Ser Val Asp Ala Asp His Asp Ala Gly Ala
1140 1145 1150

Thr Lys Glu Thr Leu Val Ile Asn Thr Val Thr Pro Leu Val Leu Asp
1155 1160 1165 1170

Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Ile Val Val Ser Gly Val Lys Asp Ala Ala
1175 1180 1185

Gly Asn Val Ala Asp Thr Ile Thr Phe Tyr Ile Lys
1190 1195

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 33 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

TTAATCGATT CTAGATGGAT AGGAAAAAAG CTG 33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 37 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATACCCGGGG GTACGGATCC GATACAGATT TGAGCAA 37

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 2766 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: beides
(D) TOPOLOGIE: linear

(vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: Bacillus stearothermophilus
(B) STAMM: PV72

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
(B) CLON(E): sbsB

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE:1..2763

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: sig_peptide
(B) LAGE:1..93

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
(B) LAGE:94..2763

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

```
ATG GCT TAT CAA CCT AAG TCT TTT CGC AAG TTT GTT GCG ACA ACT GCA      48
Met Ala Tyr Gln Pro Lys Ser Phe Arg Lys Phe Val Ala Thr Thr Ala
-31 -30                 -25                 -20

ACA GCT GCC ATT GTA GCA TCT GCG GTA GCT CCT GTA GTA TCT GCA GCA      96
Thr Ala Ala Ile Val Ala Ser Ala Val Ala Pro Val Val Ser Ala Ala
-15                 -10                 -5                  1

AGC TTC ACA GAT GTT GCG CCG CAA TAT AAA GAT GCG ATC GAT TTC TTA     144
Ser Phe Thr Asp Val Ala Pro Gln Tyr Lys Asp Ala Ile Asp Phe Leu
              5                  10                  15

GTA TCA ACT GGT GCA ACA AAA GGT AAA ACA GAA ACA AAA TTC GGC GTT     192
Val Ser Thr Gly Ala Thr Lys Gly Lys Thr Glu Thr Lys Phe Gly Val
          20                  25                  30

TAC GAT GAA ATC ACT CGT CTA GAT GCG GCA GTT ATT CTT GCA AGA GTA     240
Tyr Asp Glu Ile Thr Arg Leu Asp Ala Ala Val Ile Leu Ala Arg Val
      35                  40                  45
```

```
TTA AAA CTA GAC GTT GAC AAC GCA AAA GAC GCA GGC TTC ACA GAT GTG      288
Leu Lys Leu Asp Val Asp Asn Ala Lys Asp Ala Gly Phe Thr Asp Val
 50                  55                  60                  65

CCA AAA GAC CGT GCA AAA TAC GTC AAC GCG CTT GTA GAA GCT GGC GTA      336
Pro Lys Asp Arg Ala Lys Tyr Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Gly Val
                 70                  75                  80

TTA AAC GGT AAA GCA CCT GGC AAA TTT GGT GCA TAC GAC CCA TTA ACT      384
Leu Asn Gly Lys Ala Pro Gly Lys Phe Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Thr
             85                  90                  95

CGC GTT GAA ATG GCA AAA ATC ATC GCG AAC CGT TAC AAA TTA AAA GCT      432
Arg Val Glu Met Ala Lys Ile Ile Ala Asn Arg Tyr Lys Leu Lys Ala
         100                 105                 110

GAC GAT GTA AAA CTT CCA TTC ACT GAT GTA AAC GAT ACA TGG GCA CCA      480
Asp Asp Val Lys Leu Pro Phe Thr Asp Val Asn Asp Thr Trp Ala Pro
     115                 120                 125

TAC GTA AAA GCG CTT TAT AAA TAC GAA GTA ACC AAA AGG TTA AAA CAC      528
Tyr Val Lys Ala Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Thr Lys Arg Leu Lys His
130                 135                 140                 145

CAA CAA GCT TCG GTG CAT ACC AAA AAC ATC ACT CTG CGT GAC TTT GCG      576
Gln Gln Ala Ser Val His Thr Lys Asn Ile Thr Leu Arg Asp Phe Ala
                150                 155                 160

CAA TTT GTA TAT AGA GCG GTG AAT ATT AAT GCA GTG CCA GAA ATA GTT      624
Gln Phe Val Tyr Arg Ala Val Asn Ile Asn Ala Val Pro Glu Ile Val
            165                 170                 175

GAA GTA ACT GCG GTT AAT TCG ACT ACA GTG AAA GTA ACA TTC AAT ACG      672
Glu Val Thr Ala Val Asn Ser Thr Thr Val Lys Val Thr Phe Asn Thr
        180                 185                 190

CAA ATT GCT GAT GTT GAT TTC ACA AAT TTT GCT ATC GAT AAC GGT TTA      720
Gln Ile Ala Asp Val Asp Phe Thr Asn Phe Ala Ile Asp Asn Gly Leu
    195                 200                 205

ACT GTT ACT AAA GCA ACT CTT TCT CGT GAT AAA AAA TCC GTA GAG GTT      768
Thr Val Thr Lys Ala Thr Leu Ser Arg Asp Lys Lys Ser Val Glu Val
210                 215                 220                 225

GTG GTA AAT AAA CCG TTT ACT CGT AAT CAG GAA TAT ACA ATT ACA GCG      816
Val Val Asn Lys Pro Phe Thr Arg Asn Gln Glu Tyr Thr Ile Thr Ala
                230                 235                 240

ACA GGC ATT AAA AAT TTA AAA GGC GAG ACC GCT AAG GAA TTA ACT GGT      864
Thr Gly Ile Lys Asn Leu Lys Gly Glu Thr Ala Lys Glu Leu Thr Gly
            245                 250                 255

AAG TTT GTT TGG TCT GTT CAA GAT GCG GTA ACT GTT GCA CTA AAT AAT      912
Lys Phe Val Trp Ser Val Gln Asp Ala Val Thr Val Ala Leu Asn Asn
        260                 265                 270

AGT TCG CTT AAA GTT GGA GAG GAA TCT GGT TTA ACT GTA AAA GAT CAG      960
Ser Ser Leu Lys Val Gly Glu Glu Ser Gly Leu Thr Val Lys Asp Gln
    275                 280                 285

GAT GGC AAA GAT GTT GTA GGT GCT AAA GTA GAA CTT ACT TCT TCT AAT     1008
Asp Gly Lys Asp Val Val Gly Ala Lys Val Glu Leu Thr Ser Ser Asn
290                 295                 300                 305

ACT AAT ATT GTT GTA GTT TCA AGT GGC GAA GTA TCA GTA TCT GCT GCT     1056
Thr Asn Ile Val Val Val Ser Ser Gly Glu Val Ser Val Ser Ala Ala
                310                 315                 320
```

```
AAA GTT ACA GCT GTA AAA CCG GGA ACA GCT GAT GTT ACT GCA AAA GTT      1104
Lys Val Thr Ala Val Lys Pro Gly Thr Ala Asp Val Thr Ala Lys Val
            325                 330                 335

ACA TTA CCA GAT GGT GTT GTA CTA ACA AAT ACA TTT AAA GTG ACA GTT      1152
Thr Leu Pro Asp Gly Val Val Leu Thr Asn Thr Phe Lys Val Thr Val
        340                 345                 350

ACA GAA GTG CCT GTT CAA GTC CAA AAT CAA GGA TTT ACT TTA GTT GAT      1200
Thr Glu Val Pro Val Gln Val Gln Asn Gln Gly Phe Thr Leu Val Asp
    355                 360                 365

AAT CTT TCT AAT GCT CCA CAG AAT ACA GTT GCA TTT AAC AAA GCT GAG      1248
Asn Leu Ser Asn Ala Pro Gln Asn Thr Val Ala Phe Asn Lys Ala Glu
370                 375                 380                 385

AAA GTA ACT TCA ATG TTT GCT GGA GAA ACT AAA ACA GTT GCA ATG TAT      1296
Lys Val Thr Ser Met Phe Ala Gly Glu Thr Lys Thr Val Ala Met Tyr
                390                 395                 400

GAT ACT AAA AAC GGT GAT CCT GAA ACT AAA CCT GTT GAT TTC AAA GAT      1344
Asp Thr Lys Asn Gly Asp Pro Glu Thr Lys Pro Val Asp Phe Lys Asp
            405                 410                 415

GCA ACT GTA CGT TCA TTA AAT CCA ATT ATT GCA ACA GCT GCT ATT AAT      1392
Ala Thr Val Arg Ser Leu Asn Pro Ile Ile Ala Thr Ala Ala Ile Asn
        420                 425                 430

GGT AGT GAG CTC CTT GTC ACA GCT AAT GCT GGC CAA TCT GGA AAA GCT      1440
Gly Ser Glu Leu Leu Val Thr Ala Asn Ala Gly Gln Ser Gly Lys Ala
    435                 440                 445

TCA TTT GAA GTA ACA TTA AAA GAT AAT ACA AAA AGA ACA TTT ACA GTT      1488
Ser Phe Glu Val Thr Leu Lys Asp Asn Thr Lys Arg Thr Phe Thr Val
450                 455                 460                 465

GAT GTA AAA AAA GAC CCT GTA TTA CAA GAT ATA AAA GTA GAT GCA ACT      1536
Asp Val Lys Lys Asp Pro Val Leu Gln Asp Ile Lys Val Asp Ala Thr
                470                 475                 480

TCT GTT AAA CTT TCC GAT GAA GCT GTT GGC GGC GGG GAA GTT GAA GGA      1584
Ser Val Lys Leu Ser Asp Glu Ala Val Gly Gly Gly Glu Val Glu Gly
            485                 490                 495

GTT AAC CAA AAA ACG ATT AAA GTA AGT GCA GTT GAC CAA TAC GGT AAA      1632
Val Asn Gln Lys Thr Ile Lys Val Ser Ala Val Asp Gln Tyr Gly Lys
        500                 505                 510

GAA ATT AAA TTT GGT ACA AAA GGT AAA GTT ACT GTT ACA ACT AAT ACA      1680
Glu Ile Lys Phe Gly Thr Lys Gly Lys Val Thr Val Thr Thr Asn Thr
    515                 520                 525

GAA GGA CTA GTT ATT AAA AAT GTA AAT AGC GAT AAT ACA ATT GAC TTT      1728
Glu Gly Leu Val Ile Lys Asn Val Asn Ser Asp Asn Thr Ile Asp Phe
530                 535                 540                 545

GAT AGC GGC AAT AGT GCA ACT GAC CAA TTT GTT GTC GTT GCA ACA AAA      1776
Asp Ser Gly Asn Ser Ala Thr Asp Gln Phe Val Val Val Ala Thr Lys
                550                 555                 560

GAC AAA ATT GTC AAT GGT AAA GTA GAA GTT AAA TAT TTC AAA AAT GCT      1824
Asp Lys Ile Val Asn Gly Lys Val Glu Val Lys Tyr Phe Lys Asn Ala
            565                 570                 575

AGT GAC ACA ACA CCA ACT TCA ACT AAA ACA ATT ACT GTT AAT GTA GTA      1872
Ser Asp Thr Thr Pro Thr Ser Thr Lys Thr Ile Thr Val Asn Val Val
        580                 585                 590
```

```
AAT GTA AAA GCT GAC GCT ACA CCA GTA GGA TTA GAT ATT GTA GCA CCT      1920
Asn Val Lys Ala Asp Ala Thr Pro Val Gly Leu Asp Ile Val Ala Pro
    595                 600                 605

TCT AAA ATT GAT GTA AAT GCT CCA AAC ACT GCT TCT ACT GCA GAT GTT      1968
Ser Lys Ile Asp Val Asn Ala Pro Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asp Val
610                 615                 620                 625

GAT TTT ATA AAT TTC GAA AGT GTT GAG ATT TAC ACA CTC GAT TCA AAT      2016
Asp Phe Ile Asn Phe Glu Ser Val Glu Ile Tyr Thr Leu Asp Ser Asn
                630                 635                 640

GGT AGA CGT CAA AAA AAA GTT ACT CCA ACT GCA ACT ACA CTT GTA GGT      2064
Gly Arg Arg Gln Lys Lys Val Thr Pro Thr Ala Thr Thr Leu Val Gly
            645                 650                 655

ACA AAA AAA AAA AAA AAA GTT AAT GGG AAT GTA TTA CAA TTC AAG GGG      2112
Thr Lys Lys Lys Lys Lys Val Asn Gly Asn Val Leu Gln Phe Lys Gly
        660                 665                 670

AAC GAA GAA TTA ACG CTA TCA ACT TCT TCT AGT ACA GGA AAC GTA GAT      2160
Asn Glu Glu Leu Thr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Thr Gly Asn Val Asp
    675                 680                 685

GGA ACA GCA GAA GGA ATG ACA AAA CGT ATT CCA GGG AAA TAT ATC AAC      2208
Gly Thr Ala Glu Gly Met Thr Lys Arg Ile Pro Gly Lys Tyr Ile Asn
690                 695                 700                 705

TCT GCA AGT GTA CCT GCC AGT GCA ACA GTA GCA ACA AGT CCT GTT ACT      2256
Ser Ala Ser Val Pro Ala Ser Ala Thr Val Ala Thr Ser Pro Val Thr
                710                 715                 720

GTA AAG CTT AAT TCA AGT GAT AAT GAT TTA ACA TTT GAA GAA TTA ATA      2304
Val Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asn Asp Leu Thr Phe Glu Glu Leu Ile
            725                 730                 735

TTC GGT GTA ATT GAC CCT ACA CAA TTA GTC AAA GAT GAA GAC ATC AAC      2352
Phe Gly Val Ile Asp Pro Thr Gln Leu Val Lys Asp Glu Asp Ile Asn
        740                 745                 750

GAA TTT ATT GCA GTT TCA AAA GCG GCT AAA AAT GAT GGA TAT TTG TAT      2400
Glu Phe Ile Ala Val Ser Lys Ala Ala Lys Asn Asp Gly Tyr Leu Tyr
    755                 760                 765

AAT AAA CCG CTT GTA ACG GTT AAA GAT GCA TCA GGA AAA GTT ATT CCA      2448
Asn Lys Pro Leu Val Thr Val Lys Asp Ala Ser Gly Lys Val Ile Pro
770                 775                 780                 785

ACA GGT GCA AAT GTT TAC GGT CTA AAT CAT GAT GCA ACT AAC GGA AAC      2496
Thr Gly Ala Asn Val Tyr Gly Leu Asn His Asp Ala Thr Asn Gly Asn
                790                 795                 800

ATT TGG TTT GAT GAG GAA CAA GCT GGC TTA GCT AAA AAA TTT AGT GAT      2544
Ile Trp Phe Asp Glu Glu Gln Ala Gly Leu Ala Lys Lys Phe Ser Asp
            805                 810                 815

GTA CAT TTT GAT GTT GAT TTT TCA TTA ACT AAC GTT GTA AAA ACT GGT      2592
Val His Phe Asp Val Asp Phe Ser Leu Thr Asn Val Val Lys Thr Gly
        820                 825                 830

AGC GGT ACA GTT TCT TCA TCG CCA TCA TTA TCT GAC GCA ATT CAA CTT      2640
Ser Gly Thr Val Ser Ser Ser Pro Ser Leu Ser Asp Ala Ile Gln Leu
    835                 840                 845

ACT AAT TCA GGC GAT GCA GTA TCG TTT ACA TTA GTT ATC AAA TCA ATT      2688
Thr Asn Ser Gly Asp Ala Val Ser Phe Thr Leu Val Ile Lys Ser Ile
850                 855                 860                 865
```

```
TAT GTT AAA GGC GCA GAT AAA GAT GAT AAT AAC TTA CTT GCA GCC CCT      2736
Tyr Val Lys Gly Ala Asp Lys Asp Asp Asn Asn Leu Leu Ala Ala Pro
                870                 875                 880

GTT TCT GTC AAT GTG ACT GTG ACA AAA TAA                          2766
Val Ser Val Asn Val Thr Val Thr Lys
            885                 890
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 921 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

```
Met Ala Tyr Gln Pro Lys Ser Phe Arg Lys Phe Val Ala Thr Thr Ala
-31 -30                 -25                 -20

Thr Ala Ala Ile Val Ala Ser Ala Val Ala Pro Val Val Ser Ala Ala
-15                 -10                 -5                  1

Ser Phe Thr Asp Val Ala Pro Gln Tyr Lys Asp Ala Ile Asp Phe Leu
              5                  10                  15

Val Ser Thr Gly Ala Thr Lys Gly Lys Thr Glu Thr Lys Phe Gly Val
          20                  25                  30

Tyr Asp Glu Ile Thr Arg Leu Asp Ala Ala Val Ile Leu Ala Arg Val
      35                  40                  45

Leu Lys Leu Asp Val Asp Asn Ala Lys Asp Ala Gly Phe Thr Asp Val
 50                  55                  60                  65

Pro Lys Asp Arg Ala Lys Tyr Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Gly Val
                 70                  75                  80

Leu Asn Gly Lys Ala Pro Gly Lys Phe Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Thr
              85                  90                  95

Arg Val Glu Met Ala Lys Ile Ile Ala Asn Arg Tyr Lys Leu Lys Ala
          100                 105                 110

Asp Asp Val Lys Leu Pro Phe Thr Asp Val Asn Asp Thr Trp Ala Pro
      115                 120                 125

Tyr Val Lys Ala Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Thr Lys Arg Leu Lys His
 130                 135                 140                 145

Gln Gln Ala Ser Val His Thr Lys Asn Ile Thr Leu Arg Asp Phe Ala
                 150                 155                 160

Gln Phe Val Tyr Arg Ala Val Asn Ile Asn Ala Val Pro Glu Ile Val
              165                 170                 175

Glu Val Thr Ala Val Asn Ser Thr Thr Val Lys Val Thr Phe Asn Thr
          180                 185                 190
```

Gln Ile Ala Asp Val Asp Phe Thr Asn Phe Ala Ile Asp Asn Gly Leu
195 200 205

Thr Val Thr Lys Ala Thr Leu Ser Arg Asp Lys Lys Ser Val Glu Val
210 215 220 225

Val Val Asn Lys Pro Phe Thr Arg Asn Gln Glu Tyr Thr Ile Thr Ala
230 235 240

Thr Gly Ile Lys Asn Leu Lys Gly Glu Thr Ala Lys Glu Leu Thr Gly
245 250 255

Lys Phe Val Trp Ser Val Gln Asp Ala Val Thr Val Ala Leu Asn Asn
260 265 270

Ser Ser Leu Lys Val Gly Glu Glu Ser Gly Leu Thr Val Lys Asp Gln
275 280 285

Asp Gly Lys Asp Val Val Gly Ala Lys Val Glu Leu Thr Ser Ser Asn
290 295 300 305

Thr Asn Ile Val Val Val Ser Ser Gly Glu Val Ser Val Ser Ala Ala
310 315 320

Lys Val Thr Ala Val Lys Pro Gly Thr Ala Asp Val Thr Ala Lys Val
325 330 335

Thr Leu Pro Asp Gly Val Val Leu Thr Asn Thr Phe Lys Val Thr Val
340 345 350

Thr Glu Val Pro Val Gln Val Gln Asn Gln Gly Phe Thr Leu Val Asp
355 360 365

Asn Leu Ser Asn Ala Pro Gln Asn Thr Val Ala Phe Asn Lys Ala Glu
370 375 380 385

Lys Val Thr Ser Met Phe Ala Gly Glu Thr Lys Thr Val Ala Met Tyr
390 395 400

Asp Thr Lys Asn Gly Asp Pro Glu Thr Lys Pro Val Asp Phe Lys Asp
405 410 415

Ala Thr Val Arg Ser Leu Asn Pro Ile Ile Ala Thr Ala Ala Ile Asn
420 425 430

Gly Ser Glu Leu Leu Val Thr Ala Asn Ala Gly Gln Ser Gly Lys Ala
435 440 445

Ser Phe Glu Val Thr Leu Lys Asp Asn Thr Lys Arg Thr Phe Thr Val
450 455 460 465

Asp Val Lys Lys Asp Pro Val Leu Gln Asp Ile Lys Val Asp Ala Thr
470 475 480

Ser Val Lys Leu Ser Asp Glu Ala Val Gly Gly Gly Glu Val Glu Gly
485 490 495

Val Asn Gln Lys Thr Ile Lys Val Ser Ala Val Asp Gln Tyr Gly Lys
500 505 510

Glu Ile Lys Phe Gly Thr Lys Gly Lys Val Thr Val Thr Thr Asn Thr
515 520 525

Glu Gly Leu Val Ile Lys Asn Val Asn Ser Asp Asn Thr Ile Asp Phe
530 535 540 545

Asp Ser Gly Asn Ser Ala Thr Asp Gln Phe Val Val Val Ala Thr Lys
550 555 560

Asp Lys Ile Val Asn Gly Lys Val Glu Val Lys Tyr Phe Lys Asn Ala
565 570 575

Ser Asp Thr Thr Pro Thr Ser Thr Lys Thr Ile Thr Val Asn Val Val
580 585 590

Asn Val Lys Ala Asp Ala Thr Pro Val Gly Leu Asp Ile Val Ala Pro
595 600 605

Ser Lys Ile Asp Val Asn Ala Pro Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asp Val
610 615 620 625

Asp Phe Ile Asn Phe Glu Ser Val Glu Ile Tyr Thr Leu Asp Ser Asn
630 635 640

Gly Arg Arg Gln Lys Lys Val Thr Pro Thr Ala Thr Thr Leu Val Gly
645 650 655

Thr Lys Lys Lys Lys Lys Val Asn Gly Asn Val Leu Gln Phe Lys Gly
660 665 670

Asn Glu Glu Leu Thr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Thr Gly Asn Val Asp
675 680 685

Gly Thr Ala Glu Gly Met Thr Lys Arg Ile Pro Gly Lys Tyr Ile Asn
690 695 700 705

Ser Ala Ser Val Pro Ala Ser Ala Thr Val Ala Thr Ser Pro Val Thr
710 715 720

Val Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asn Asp Leu Thr Phe Glu Glu Leu Ile
725 730 735

Phe Gly Val Ile Asp Pro Thr Gln Leu Val Lys Asp Glu Asp Ile Asn
740 745 750

Glu Phe Ile Ala Val Ser Lys Ala Ala Lys Asn Asp Gly Tyr Leu Tyr
755 760 765

Asn Lys Pro Leu Val Thr Val Lys Asp Ala Ser Gly Lys Val Ile Pro
770 775 780 785

Thr Gly Ala Asn Val Tyr Gly Leu Asn His Asp Ala Thr Asn Gly Asn
790 795 800

Ile Trp Phe Asp Glu Glu Gln Ala Gly Leu Ala Lys Lys Phe Ser Asp
805 810 815

Val His Phe Asp Val Asp Phe Ser Leu Thr Asn Val Val Lys Thr Gly
820 825 830

Ser Gly Thr Val Ser Ser Ser Pro Ser Leu Ser Asp Ala Ile Gln Leu
835 840 845

Thr Asn Ser Gly Asp Ala Val Ser Phe Thr Leu Val Ile Lys Ser Ile
850 855 860 865

Tyr Val Lys Gly Ala Asp Lys Asp Asp Asn Asn Leu Leu Ala Ala Pro
870 875 880

Val Ser Val Asn Val Thr Val Thr Lys
885 890

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 498 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: beides
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CCCATGGACC CGTCCAAGGA CTCCAAAGCT CAGGTTTCTG CAGCCGAAGC TGGTATCACT 60

GGCACCTGGT ATAACCAACT GGGGTCGACT TTCATTGTGA CCGCTGGTGC GGACGGAGCT 120

CTGACTGGCA CCTACGAATC TGCGGTTGGT AACGCAGAAT CCCGCTACGT ACTGACTGGC 180

CGTTATGACT CTGCACCTGC CACCGATGGC TCTGGTACCG CTCTGGGCTG GACTGTGGCT 240

TGGAAAAACA ACTATCGTAA TGCGCACAGC GCCACTACGT GGTCTGGCCA ATACGTTGGC 300

GGTGCTGAGG CTCGTATCAA CACTCAGTGG CTGTTAACAT CCGGCACTAC CGAAGCGAAT 360

GCATGGAAAT CGACACTAGT AGGTCATGAC ACCTTTACCA AAGTTAAGCC TTCTGCTGCT 420

AGCATTGATG CTGCCAAGAA AGCAGGCGTA AACAACGGTA ACCCTCTAGA CGCTGTTCAG 480

CAATAATAAG GATCCGGG 498

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

TTCATCGTAA ACGCCGAATT TTGTTTCTG 29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AGGGAAATAT ATCAACTCTG CAAGTG 26

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von S-Layer-Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man
   (a) eine gram-negative prokaryontische Wirtszelle bereitstellt, die transformiert ist mit einer für ein S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure, ausgewählt aus
      (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis Position 3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
      (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
      (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt;
   (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen und
   (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle gewinnt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man eine E.coli-Wirtszelle verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das Polypeptid in Form einer assemblierten S-Layer-Struktur aus dem Inneren der Wirtszelle gewinnt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure eine oder mehrere Insertionen enthält, die für Peptid- oder Polypeptidsequenzen kodieren.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen ausgewählt werden aus Nukleotidsequenzen, die für Cysteinreste, Bereiche mit mehreren geladenen Aminosäuren oder Tyr-Resten, DNA-bindende Epitope, metallbindende Epitope, immunogene Epitope, allergene Epitope, antigene Epitope, Streptavidin, Enzyme, Cytokine oder Antikörper-bindende Proteine kodieren.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für Streptavidin kodieren.

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für immunogene Epitope aus Herpesviren, insbesondere Herpesvirus 6 oder FMDV, kodieren.

8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für Enzyme, wie etwa Polyhydroxybuttersäuresynthase oder bakterielle Luciferase, kodieren.

9. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für Cytokine, wie etwa Interleukine, Interferone oder Tumornekrosefaktoren, kodieren.

10. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet,

daß die Insertionen für Antikörper-bindende Proteine, wie etwa Protein A oder Protein G, kodieren.

11. Verfahren nach Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Insertionen für antigene Epitope kodieren, die an Cytokine oder Endotoxine binden.

12. Verfahren nach Anspruch 5,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Insertionen für metallbindende Epitope kodieren.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß 5'-seitig der für das S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure in operativer Verknüpfung eine für ein gram-positives Signalpeptid kodierende Nukleinsäure angeordnet ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die für das Signalpeptid kodierende Nukleinsäure
(a) den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt der in SEQ ID NO.1 dargestellten Nukleotidsequenz,
(b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder/und
(c) eine zu den Sequenzen aus (a) oder/und (b) mindestens 80% homologe Nukleotidsequenz umfaßt.

15. Nukleinsäure, die für ein rekombinantes S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus
(i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,

(ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und

(iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt,

wobei die Nukleinsäure innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält.

16. Nukleinsäure nach Anspruch 15, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Insertionsstelle an Position 582, 878, 917, 2504 oder/und 2649 der in SEQ ID No. 1 gezeigten Nukleotidsequenz lokalisiert ist.

17. Vektor, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 oder 16 enthält.

18. Zelle, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß sie mit einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 oder 16 oder einem Vektor nach Anspruch 17 transformiert ist.

19. Zelle nach Anspruch 18, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß sie eine gram-negative prokaryontische Zelle, insbesondere eine E.coli-Zelle ist.

20. Zelle nach Anspruch 18 oder 19, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß sie eine rekombinante S-Layer-Struktur enthält.

21. Rekombinantes S-Layer-Protein, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,

daß es von einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 oder 16 kodiert ist.

22. Rekombinante S-Layer-Struktur,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß sie als Untereinheit mindestens ein Protein nach Anspruch 21 enthält.

23. S-Layer-Struktur nach Anspruch 22,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß sie weiterhin als Untereinheit mindestens ein nicht-modifiziertes S-Layer-Protein enthält.

24. S-Layer-Struktur nach Anspruch 22 oder 23,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß sie mehrere kovalent oder durch Affinitätsbindung miteinander verknüpfte Schichten umfaßt.

25. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 21 oder einer S-Layer-Struktur nach einem der Ansprüche 22 bis 24 als Vakzin oder Adjuvans.

26. Verwendung nach Anspruch 25,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß das Vakzin oder Adjuvans weiterhin einen Bakterien-ghost umfaßt, der gegebenfalls in seiner Membran weitere immunogene Epitope enthält.

27. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 21 oder einer S-Layer-Struktur nach einem der Ansprüche 22 bis 24 als Enzymreaktor.

28. Nukleinsäure, die für ein S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus
(i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz ge-

gebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,

(ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und

(iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

29. Nukleinsäure nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß sie innerhalb das für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält.

30. Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 28 oder 29 enthält.

31. Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einer Nukleinsäure nach Anspruch 28 oder 29 oder einem Vektor nach Anspruch 30 transformiert ist.

32. Zelle nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine rekombinante S-Layer-Struktur enthält.

33. S-Layer-Protein, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer Nukleinsäure nach Anspruch 29 kodiert ist.

34. Rekombinante S-Layer-Struktur,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß sie als Untereinheit mindestens ein rekombinantes S-Layer-Protein enthält, das von einer Nukleinsäure nach Anspruch 29 kodiert ist.

35. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 33 oder einer S-Layer-Struktur nach Anspruch 34 als Vakzin oder Adjuvans.

36. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 33 oder einer S-Layer-Struktur nach Anspruch 34 als Enzymreaktor.

37. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten S-Layer-Proteinen,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man
(a) eine Wirtszelle bereitstellt, die eine für ein S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure enthält, die innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält,
(b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen, und
(c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle oder dem Kulturmedium gewinnt.

38. Verfahren nach Anspruch 37,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure ausgewählt wird aus
(i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO.1 gezeigte Nukleotidsequenz gege-

benenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,

(ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und

(iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

39. Verfahren nach Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, daß die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure ausgewählt wird aus

(i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,

(ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und

(iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 37-39, dadurch gekennzeichnet, daß in der Wirtszelle ein weiteres S-Layer-Gen exprimiert wird, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert.

41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, daß das nichtmodifizierte S-Layer-Protein in der Lage ist, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden.

42. Verfahren nach einem der Ansprüche 37-39, dadurch gekennzeichnet, daß in der Wirtszelle kein weiteres S-Layer-Gen exprimiert wird, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert, welches in der Lage ist, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden.

43. Verfahren nach einem der Ansprüche 37-42, dadurch gekennzeichnet, daß man eine prokaryontische Wirtszelle verwendet.

44. Verfahren nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß man eine gram-positive Wirtszelle verwendet.

45. Verfahren nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß man B.stearothermophilus verwendet.

Fig.1



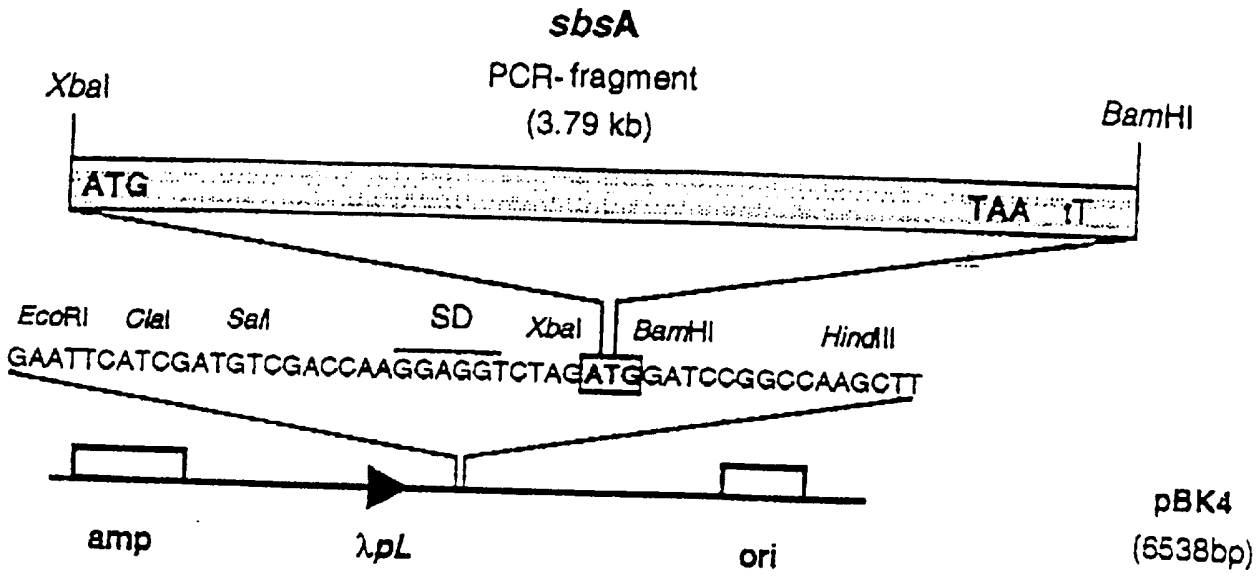
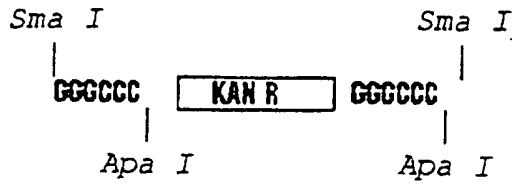

sbsA
PCR-fragment
(3.79 kb)
XbaI
BamHI
ATG
TAA
EcoRI
ClaI
SalI
SD
XbaI
BamHI
HindIII
GAATTCATCGATGTCGACCAAGGAGGTCTAGATGGATCCGGCCAAGCTT
amp
λpL
ori
pBK4
(6538bp)

Fig.2



A)


Sma I
Sma I
GGGCCC
KAN R
GGGCCC
Apa I
Apa I

B)


GGGCCC
KAN R
GGGCCC
Apa I
Apa I

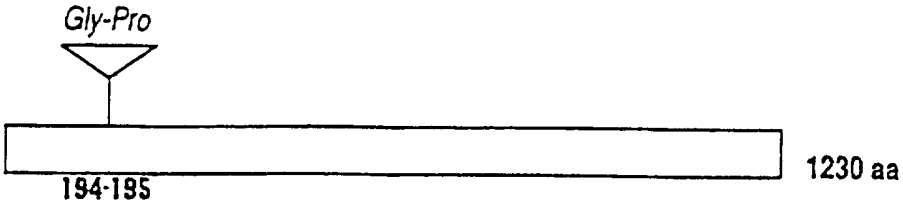
C)


GGGCCC

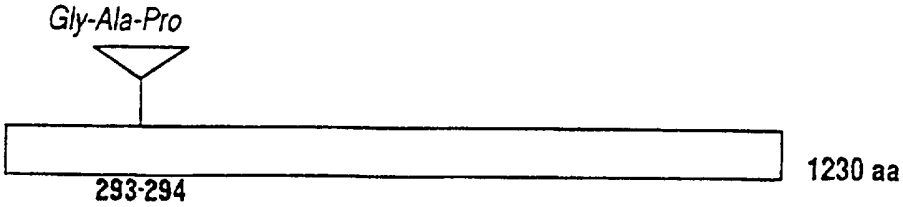
Fig.3



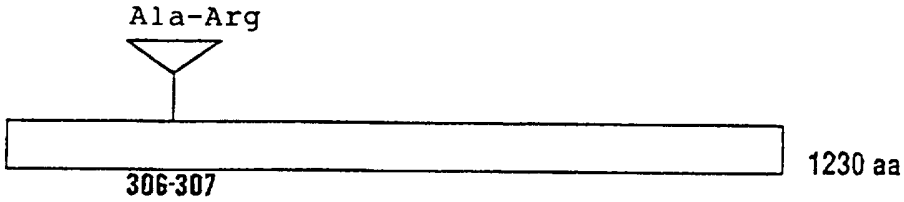
A)


Gly-Pro
194-195
1230 aa

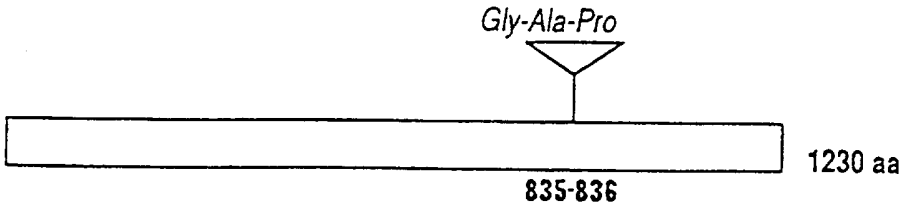
B)


Gly-Ala-Pro
293-294
1230 aa

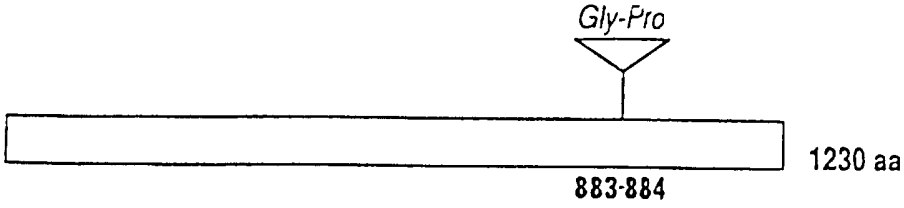
C)


Ala-Arg
306-307
1230 aa

D)


Gly-Ala-Pro
835-836
1230 aa

E)


Gly-Pro
883-884
1230 aa

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In' tional Application No
PCT/EP 97/00432

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/31 C12N15/70 C12N15/62 C07K14/32 C12N1/21 A61K39/07

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K C12N C12P A61K

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | WO 95 19371 A (SOLVAY ;DEBLAERE ROLF Y (BE); DESOMER JAN (BE); DHAESE PATRICK (BE) 20 July 1995 | 37,40-44 |
| A | see the whole document | 1-36 |
| | --- | |
| X | DE 44 25 527 A (VOGELBUSCH GMBH) 25 January 1996 cited in the application | 15,17, 18, 20-38, 43-45 |
| Y | see the whole document | 1,2,4-6, 13,14,19 |
| | --- | |
| | -/-- | |

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

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

3

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 12 June 1997 | 01.07.97 |

| Name and mailing address of the ISA | Authorized officer |
|---|---|
| European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. ( + 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax ( + 31-70) 340-3016 | Kania, T |

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

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 40, no. 9, September 1994, pages 777-782, XP000674689 BINGLE W. AND SMIT J.: "Alkaline phosphatase and a cellulase reporter protein are not exported from the cytoplasm when fused to large N-terminal portions of the Caulobacter crescentus surface (S)-layer protein" cited in the application see the whole document --- | 1,2,4-6, 13,14,19 |
| A | MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 9, no. 1, 1993, pages 97-109, XP000674434 PEYRET J. ET AL.: "Characterization of the cspB gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in Corynebacterium glutamicum" cited in the application * siehe das ganze Dokument, bes. S.98 letzter Absatz bis S.99 * --- | 1,2,4,5 |
| A | WO 91 13155 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 5 September 1991 see the whole document --- | 26 |
| A | GENE, vol. 145, no. 1, 1994, pages 115-120, XP002032765 KUEN B. ET AL.: "Sequence analysis of the sbsA gene encoding the 130-kDa surface-layer protein of bacillus stearothermophilus strain PV72" cited in the application see the whole document --- | 1-27,37, 38,40-45 |
| A | JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 176, no. 23, December 1994, pages 7182-7189, XP000674692 SARA M. AND SLEYTR U.: "Comparative studies of S-layer proteins from Bacillus stearothermophilus strains expressed during growth in continuous culture under oxygen-limited and non-oxygen-limited conditions" cited in the application see the whole document --- | 28-37, 39-45 |

-/--

3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/00432

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| P,X | MOLECULAR MICROBIOLOGY,<br>vol. 19, no. 3, February 1996,<br>pages 495-503, XP000675407<br>KUEN B. ET AL.: "Heterologous expression and self-assembly of the S-layer protein SbsA of Bacillus stearothermophilus in Escherichia coli"<br>see the whole document | 1-3,13,<br>14 |
| T | JOURNAL OF BACTERIOLOGY,<br>vol. 179, no. 5, March 1997,<br>pages 1664-1670, XP000674432<br>KUEN B. ET AL.: "Molecular characterization of the Bacillus stearothermophilus PV72 S-layer gene sbsB induced by oxidative stress"<br>see the whole document | 28-45 |
| T | TIBTECH,<br>vol. 15, no. 1, January 1997,<br>pages 20-26, XP002032144<br>SLEYTR U. AND SARA M: "Bacterial and archaeal S-layer proteins: structure-function relationships and their biotechnological applications"<br>see the whole document | 1-45 |

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

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ EP 97/ 00432

**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. [X] Claims Nos.: 25, 26, 35
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Observation: although claims 25, 26 and 35 concern a process for treatment of the human or animal body, the search was carried out and based on the cited effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
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:

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.:

**Remark on Protest**

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter ɔnal Application No
PCT/EP 97/00432

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| WO 9519371 A | 20-07-95 | EP 0738278 A | 23-10-96 |
| DE 4425527 A | 25-01-96 | NONE | |
| WO 9113155 A | 05-09-91 | DE 4005874 A | 07-11-91 |
| | | AU 7237391 A | 18-09-91 |
| | | DE 59101580 D | 09-06-94 |
| | | EP 0516655 A | 09-12-92 |
| | | IE 64613 B | 23-08-95 |
| | | JP 5503014 T | 27-05-93 |
| | | US 5470573 A | 28-11-95 |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. nales Aktenzeichen
PCT/EP 97/00432

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/31 C12N15/70 C12N15/62 C07K14/32 C12N1/21
A61K39/07

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )
IPK 6 C07K C12N C12P A61K

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* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|---|---|---|
| X | WO 95 19371 A (SOLVAY ;DEBLAERE ROLF Y (BE); DESOMER JAN (BE); DHAESE PATRICK (BE) 20.Juli 1995 | 37,40-44 |
| A | siehe das ganze Dokument | 1-36 |
| | --- | |
| X | DE 44 25 527 A (VOGELBUSCH GMBH) 25.Januar 1996 in der Anmeldung erwähnt | 15,17, 18, 20-38, 43-45 |
| Y | siehe das ganze Dokument | 1,2,4-6, 13,14,19 |
| | --- | |
| | -/-- | |

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

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

3

| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts |
|---|---|
| 12.Juni 1997 | 01. 07. 97 |
| **Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde** | **Bevollmächtigter Bediensteter** |
| Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax (+ 31-70) 340-3016 | Kania, T |

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

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/00432

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|---|---|---|
| Y | CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, Bd. 40, Nr. 9, September 1994, Seiten 777-782, XP000674689 BINGLE W. AND SMIT J.: "Alkaline phosphatase and a cellulase reporter protein are not exported from the cytoplasm when fused to large N-terminal portions of the Caulobacter crescentus surface (S)-layer protein" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument | 1,2,4-6, 13,14,19 |
| A | MOLECULAR MICROBIOLOGY, Bd. 9, Nr. 1, 1993, Seiten 97-109, XP000674434 PEYRET J. ET AL.: "Characterization of the cspB gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in Corynebacterium glutamicum" in der Anmeldung erwähnt * siehe das ganze Dokument, bes. S.98 letzter Absatz bis S.99 * | 1,2,4,5 |
| A | WO 91 13155 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 5.September 1991 siehe das ganze Dokument | 26 |
| A | GENE, Bd. 145, Nr. 1, 1994, Seiten 115-120, XP002032765 KUEN B. ET AL.: "Sequence analysis of the sbsA gene encoding the 130-kDa surface-layer protein of bacillus stearothermophilus strain PV72" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument | 1-27,37, 38,40-45 |
| A | JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 176, Nr. 23, Dezember 1994, Seiten 7182-7189, XP000674692 SARA M. AND SLEYTR U.: "Comparative studies of S-layer proteins from Bacillus stearothermophilus strains expressed during growth in continuous culture under oxygen-limited and non-oxygen-limited conditions" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument | 28-37, 39-45 |

-/--

3

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/00432

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|---|---|---|
| P,X | MOLECULAR MICROBIOLOGY,<br>Bd. 19, Nr. 3, Februar 1996,<br>Seiten 495-503, XP000675407<br>KUEN B. ET AL.: "Heterologous expression and self-assembly of the S-layer protein SbsA of Bacillus stearothermophilus in Escherichia coli"<br>siehe das ganze Dokument<br>--- | 1-3,13,<br>14 |
| T | JOURNAL OF BACTERIOLOGY,<br>Bd. 179, Nr. 5, März 1997,<br>Seiten 1664-1670, XP000674432<br>KUEN B. ET AL.: "Molecular characterization of the Bacillus stearothermophilus PV72 S-layer gene sbsB induced by oxidative stress"<br>siehe das ganze Dokument<br>--- | 28-45 |
| T | TIBTECH,<br>Bd. 15, Nr. 1, Januar 1997,<br>Seiten 20-26, XP002032144<br>SLEYTR U. AND SARA M: "Bacterial and archaeal S-layer proteins: structure-function relationships and their biotechnological applications"<br>siehe das ganze Dokument<br>----- | 1-45 |

3

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/00432

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

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

1. [X] Ansprüche Nr. 25,26,35
weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 25,26,35 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

2. [ ] Ansprüche Nr.
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

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 2 auf Blatt 1)**

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

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

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

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

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

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

[ ] Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

[ ] Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/00432

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|---|---|---|
| WO 9519371 A | 20-07-95 | EP 0738278 A | 23-10-96 |
| DE 4425527 A | 25-01-96 | KEINE | |
| WO 9113155 A | 05-09-91 | DE 4005874 A | 07-11-91 |
| | | AU 7237391 A | 18-09-91 |
| | | DE 59101580 D | 09-06-94 |
| | | EP 0516655 A | 09-12-92 |
| | | IE 64613 B | 23-08-95 |
| | | JP 5503014 T | 27-05-93 |
| | | US 5470573 A | 28-11-95 |