



(19)  
 Bundesrepublik Deutschland  
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2005 005 737 A1** 2006.08.17

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2005 005 737.3**

(22) Anmeldetag: **07.02.2005**

(43) Offenlegungstag: **17.08.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 14/195** (2006.01)  
**C07K 14/38** (2006.01)

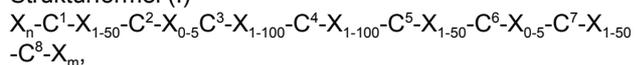
(71) Anmelder:  
**BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE**

(72) Erfinder:  
**Subkowski, Thomas, Dr., 68526 Ladenburg, DE;**  
**Karos, Marvin, Dr., 67433 Neustadt, DE; Lemaire,**  
**Hans-Georg, Dr., 67117 Limburgerhof, DE; Barg,**  
**Heiko, Dr., 67346 Speyer, DE; Bollschweiler, Claus,**  
**Dr., 69118 Heidelberg, DE**

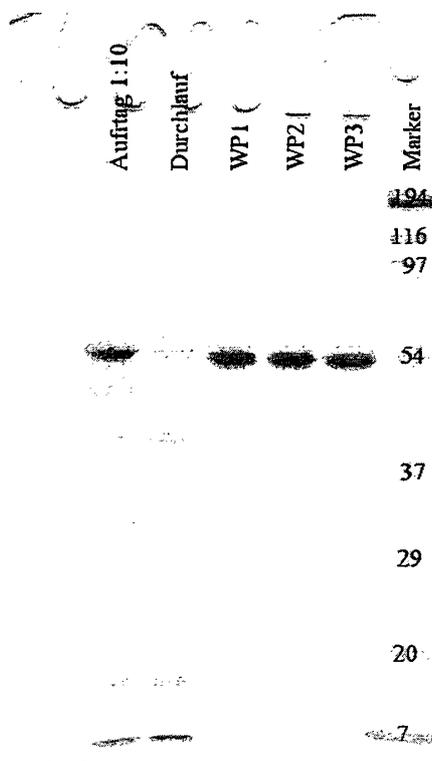
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Neue Hydrophobinfusionsproteine, deren Herstellung und Verwendung**

(57) Zusammenfassung: Polypeptide der allgemeinen Strukturformel (I)



deren Herstellung und Verwendung.



**Beschreibung**

## Stand der Technik

**[0001]** Hydrophobine sind kleine Proteine von etwa 100 AS, die charakteristisch für filamentöse Pilze sind und nicht in anderen Organismen vorkommen. Kürzlich wurden Hydrophobin-ähnliche Proteine in *Streptomyces coelicolor* entdeckt, die als "Chapline" bezeichnet werden und ebenfalls hoch oberflächenaktive Eigenschaften haben. An Wasser/Luft-Grenzflächen können sich Chapline zu Amyloid-ähnlichen Fibrillen assemblieren (Classen et al. 2003 *Genes Dev* 1714-1726; Elliot et al. 2003, *Genes Dev.* 17, 1727-1740).

**[0002]** Hydrophobine sind in einer wasserunlöslichen Form auf der Oberfläche von verschiedenen pilzlichen Strukturen, wie z.B. Lufthyphen, Sporen, Fruchtkörpern, verteilt. Die Gene für Hydrophobine konnten aus Ascomyzeten, Deuteromyceten und Basidiomyceten isoliert werden. Einige Pilze enthalten mehr als ein Hydrophobingen, z.B. *Schizophyllum commune*, *Coprinus cinereus*, *Aspergillus nidulans*. Offensichtlich sind verschiedene Hydrophobine in unterschiedlichen Stadien der pilzlichen Entwicklung involviert. Die Hydrophobine sind dabei vermutlich verantwortlich für unterschiedliche Funktionen (van Wetter et al., 2000, *Mol. Microbiol.*, 36, 201-210; Kershaw et al. 1998, *Fungal Genet. Biol*, 1998, 23, 18-33).

**[0003]** Als biologische Funktion für Hydrophobine wird neben der Reduzierung der Oberflächenspannung von Wasser zur Generierung von Lufthyphen auch die Hydrophobisierung von Sporen beschrieben (Wösten et al. 1999, *Curr. Biol.*, 19, 1985-88; Bell et al. 1992, *Genes Dev.*, 6, 2382-2394). Weiterhin dienen Hydrophobine zur Auskleidung von Gaskanälen in Fruchtkörpern von Flechten und als Komponenten im Erkennungssystem von pflanzlichen Oberflächen durch pilzliche Pathogene (Lugones et al. 1999, *Mycol. Res.*, 103, 635-640; Hamer & Talbot 1998, *Curr. Opinion Microbiol.*, Band 1, 693-697).

**[0004]** Komplementationsexperimente haben gezeigt, dass Hydrophobine sich innerhalb einer Klasse bis zu einem gewissen Grad funktionell ersetzen können.

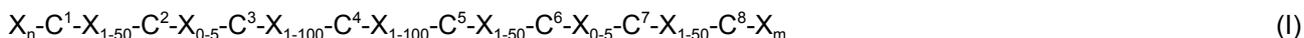
**[0005]** Die bisher bekannten Hydrophobine lassen sich mit üblichen proteinchemischen Reinigungs- und Isolationsverfahren nur in mässiger Ausbeute und Reinheit darstellen. Auch Versuche, mit Hilfe von gentechnischen Verfahren, grössere Mengen an Hydrophobinen bereitzustellen, waren bisher nicht erfolgreich.

## Aufgabenstellung

**[0006]** Es bestand die Aufgabe, neuartige Hydrophobine und deren Herstellungsverfahren bereitzustellen, die eine wirtschaftliche Produktion der Hydrophobine und deren Einsatz auf verschiedenen technischen Gebieten erlauben.

## Beschreibung der Erfindung

**[0007]** Gegenstand der Erfindung sind Polypeptide der allgemeinen Strukturformel (I)

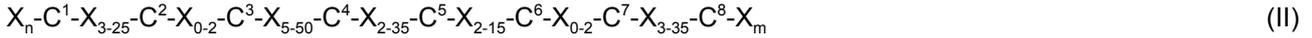


wobei X für jede der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren (Phe, Leu, Ser, Tyr, Cys, Trp, Pro, His, Gln, Arg, Ile, Met, Thr, Asn, Lys, Val, Ala, Asp, Glu, Gly) stehen kann und die bei X stehenden Indizes die Anzahl der Aminosäuren darstellen, wobei die Indizes n und m für Zahlen zwischen 0 und 500, bevorzugt zwischen 15 und 300, stehen und C für Cystein steht, mit der Maßgabe, dass wenigstens eine der mit  $X_n$  oder  $X_m$  abgekürzten Peptidsequenzen für eine mindestens 20 Aminosäuren lange Peptidsequenz steht, die natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpft ist, die nach Beschichten einer Glasoberfläche eine Kontaktwinkeländerung von mindestens 20° bewirken.

**[0008]** Die mit  $C^1$  bis  $C^8$  benannten Cysteine können in den erfindungsgemässen Proteinen entweder reduziert vorliegen oder miteinander Disulfidbrücken ausbilden. Besonders bevorzugt ist die intramolekulare Ausbildung von C-C Brücken, insbesondere die mit mindestens einer, bevorzugt 2, besonders bevorzugt 3 und ganz besonders bevorzugt 4 intramolekularen Disulfidbrücken ausgewählt aus der folgenden Gruppe:  $C^1$  mit  $C^2$ ;  $C^3$  mit  $C^4$ ,  $C^5$  mit  $C^6$ ,  $C^7$  mit  $C^8$ .

**[0009]** Falls in den mit X bezeichneten Positionen auch Cysteine verwendet werden, kann sich die Nummerierung der einzelnen Cysteinpositionen in den allgemeinen Formeln entsprechend verändern.

**[0010]** Besonders vorteilhafte Polypeptide sind solche der allgemeinen Formel (II)



wobei X für jede der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren (Phe, Leu, Ser, Tyr, Cys, Trp, Pro, His, Gln, Arg, Ile Met, Thr, Asn, Lys, Val, Ala, Asp, Glu, Gly) stehen kann und die bei X stehenden Indizes die Anzahl der Aminosäuren darstellen, wobei die Indizes n und m für Zahlen zwischen 2 und 300 stehen und C für Cystein steht, mit der Maßgabe, dass wenigstens eine der mit  $X_n$  oder  $X_m$  abgekürzten Peptidsequenzen für eine mindestens 35 Aminosäuren lange Peptidsequenz steht, die natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpft ist,

die nach Beschichten einer Glasoberfläche eine Kontaktwinkeländerung von mindestens 20° bewirken.

**[0011]** Ganz besonders vorteilhaft sind solche Polypeptide der allgemeinen Formel (III)



wobei X für jede der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren (Phe, Leu, Ser, Tyr, Cys, Trp, Pro, His, Gln, Arg, Ile Met, Thr, Asn, Lys, Val, Ala, Asp, Glu, Gly) stehen kann und die bei X stehenden Indizes die Anzahl der Aminosäuren darstellen, wobei die Indizes n und m für Zahlen zwischen 0 und 200 stehen und C für Cystein steht, mit der Maßgabe, dass wenigstens eine der mit  $X_n$  oder  $X_m$  abgekürzten Peptidsequenzen für eine mindestens 40 Aminosäuren lange Peptidsequenz steht, die natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpft ist,

die nach Beschichten einer Glasoberfläche eine Kontaktwinkeländerung von mindestens 20° bewirken.

**[0012]** Bevorzugte Ausführungsformen der beschriebenen Erfindung sind Polypeptide mit der allgemeinen Strukturformel (I) (II) oder (III), wobei diese Strukturformel mindestens ein Hydrophobin der Klasse I, bevorzugt mindestens ein Hydrophobin dewA, rodA, hypA, hypB, sc3, basf1, basf2, oder Teile oder Derivate davon umfasst. Die genannten Hydrophobine sind im nachfolgenden Sequenzprotokoll strukturell charakterisiert. Es können auch mehrere Hydrophobine, bevorzugt 2 oder 3, gleicher oder unterschiedlicher Struktur miteinander verknüpft und mit einer entsprechenden geeigneten Polypeptidsequenz, die natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verbunden ist, verknüpft werden.

**[0013]** Besonders bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind die neuen Proteine mit der in SEQ ID NO: 20, 22, 24 dargestellten Polypeptidsequenzen sowie den dafür codierenden Nukleinsäuresequenzen, insbesondere den Sequenzen gemäss SEQ ID NO: 19, 21, 23. Auch Proteine, die sich ausgehend von den in SEQ ID NO. 22, 22 oder 24 dargestellten Polypeptidsequenzen durch Austausch, Insertion oder Deletion von mindestens einer, bis hin zu 10. bevorzugt 5, besonders bevorzugt 5% aller Aminosäuren ergeben, und die die biologische Eigenschaft der Ausgangsproteine noch zu mindestens 50% besitzen, sind besonders bevorzugte Ausführungsformen. Unter biologischer Eigenschaft der Proteine wird hierbei die Änderung des Kontaktwinkels wie in Beispiel 10 beschrieben, verstanden.

**[0014]** Die erfindungsgemässen Proteine tragen an mindestens einer Position, die mit  $X_n$  oder  $X_m$  abgekürzt wird, eine Polypeptidsequenz aus mindestens 20 bevorzugt mindestens 35 besonders bevorzugt mindestens 50 und insbesondere mindestens 100 Aminosäuren (im folgenden auch Fusionspartner genannt), die nicht natürlicherweise mit einem Hydrophobin verknüpft ist. Damit soll ausgedrückt werden, dass die erfindungsgemässen Proteine aus einem Hydrophobinteil und einem Fusionspartnerteil bestehen, die in der Natur nicht zusammen in dieser Form vorkommen.

**[0015]** Der Fusionspartnerteil kann aus einer Vielzahl von Proteinen ausgewählt werden. Es können auch mehrere Fusionspartner mit einem Hydrophobinteil verknüpft werden, beispielsweise am Aminoterminus ( $X_n$ ) und am Carboxyterminus ( $X_m$ ) des Hydrophobinteils. Es können aber auch beispielsweise zwei Fusionspartner mit einer Position ( $X_n$  oder  $X_m$ ) des erfindungsgemässen Proteins verknüpft werden.

**[0016]** Als Fusionspartner sind besonders bevorzugt solche Polypeptidsequenzen, die dazu führen, dass das erfindungsgemässe Protein zur Beschichtung von Glasoberflächen fähig ist und die mit Protein behandelte Glasoberfläche resistent wird gegenüber einer Detergenzbehandlung, wie sie im experimentellen Teil (Beispiel 10) ausführlich beschrieben ist (z.B. 1 % SDS/80°C/10 min) ist.

**[0017]** Besonders geeignete Fusionspartner sind Polypeptide, die natürlicherweise in Mikroorganismen, insbesondere in E. coli oder Bacillus subtilis vorkommen. Beispiele für solche Fusionspartner sind die Sequenzen

yaad (SEQ ID NO:15 und 16), yaae (SEQ ID NO:17 und 18), und Thioredoxin. Gut geeignet sind auch Fragmente oder Derivate dieser genannten Sequenzen, die nur einen Teil, bevorzugt 70-99%, besonders bevorzugt 80-98% der genannten Sequenzen umfassen, oder bei denen einzelne Aminosäuren, bzw. Nukleotide gegenüber der genannten Sequenz verändert sind.

**[0018]** Die erfindungsgemässen Proteine können auch noch in ihrer Polypeptidsequenz modifiziert sein, beispielsweise durch Glycosilierung, Acetylierung oder auch durch chemische Quervernetzung beispielsweise mit Glutardialdehyd.

**[0019]** Eine Eigenschaft der erfindungsgemässen Proteine ist die Änderung von Oberflächeneigenschaften, wenn die Oberflächen mit den Proteinen beschichtet werden. Die Änderung der Oberflächeneigenschaften lässt sich experimentell dadurch bestimmen, dass der Kontaktwinkel eines Wassertropfens vor und nach der Beschichtung der Oberfläche mit dem erfindungsgemässen Protein gemessen wird und die Differenz der beiden Messungen ermittelt wird.

**[0020]** Die genauen experimentellen Bedingungen zur Messung des Kontaktwinkels sind im experimentellen Teil in Beispiel 10 niedergelegt. Unter diesen Bedingungen besitzen die erfindungsgemässen Proteine die Eigenschaft, den Kontaktwinkel um mindestens 20, bevorzugt 25, besonders bevorzugt 30 Grad zu vergrössern.

**[0021]** Im Hydrophobinteil der bisher bekannten Hydrophobine sind die Positionen der polaren und unpolaren Aminosäuren konserviert, was sich in einem charakteristischen Hydrophobizitätsplot äußert. Unterschiede in den biophysikalischen Eigenschaften und in der Hydrophobizität führten zur Einteilung der bisher bekannten Hydrophobine in zwei Klassen, I und II (Wessels et al. 1994, Ann. Rev. Phytopathol., 32, 413-437).

**[0022]** Die assemblierten Membranen aus Klasse I Hydrophobinen sind hochgradig unlöslich (selbst gegenüber 1 % SDS bei erhöhter Temperatur) und können nur durch konzentrierte Trifluoressigsäure (TFA), bzw. Ameisensäure wieder dissoziiert werden. Im Gegensatz dazu sind die assemblierten Formen von Klasse II Hydrophobinen weniger stabil. Sie können bereits durch 60%iges Ethanol, bzw. 1 % SDS (bei Raumtemperatur) wieder aufgelöst werden.

**[0023]** Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt, dass die Länge des Bereichs zwischen Cystein C<sup>3</sup> und C<sup>4</sup> bei Klasse II Hydrophobinen deutlich kürzer ist, als bei Hydrophobinen der Klasse I.

**[0024]** Klasse II Hydrophobine weisen weiterhin mehr geladene Aminosäuren als Klasse I auf.

**[0025]** Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemässen Proteine. Diese Polypeptide lassen sich chemisch durch bekannte Verfahren der Peptidsynthese beispielsweise durch Festphasensynthese nach Merrifield herstellen.

**[0026]** Besonders geeignet sind jedoch gentechnische Verfahren, bei denen eine für den Fusionspartner und eine für den Hydrophobinteil codierende Nukleinsäuresequenz, insbesondere DNA-Sequenz, so kombiniert werden, dass in einem Wirtsorganismus durch Genexpression der kombinierten Nukleinsäuresequenz das gewünschte Protein erzeugt wird.

**[0027]** Geeignete Wirtsorganismen (Produktionsorganismen) können dabei Prokaryonten (einschliesslich der Archaea) oder Eukaryonten sein, besonders Bakterien einschliesslich Halobacterien und Methanococcen, Pilze, Insektenzellen, Pflanzenzellen und Säugerzellen, besonders bevorzugt *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*, *Pseudomonas spec.*, *Lactobacillen*, *Hansenula polymorpha*, *Trichoderma reesei*, SF9 (bzw. verwandte Zellen) u.a.

**[0028]** Gegenstand der Erfindung sind ausserdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemässes Polypeptid codierende Nukleinsäuresequenz, sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

**[0029]** Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemässen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz.

**[0030]** Unter einer "operativen Verknüpfung" versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weitererregulativer Elemente derart, dass jedes der regulati-

ven Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäss erfüllen kann.

**[0031]** Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen. Geeignete regulatorische Sequenzen sind z. B. beschrieben in Goeddel, Gene Expression Technology : Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

**[0032]** Zusätzlich zu diesen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde.

**[0033]** Ein bevorzugtes Nukleinsäurekonstrukt enthält vorteilhafterweise auch eine oder mehrere der schon erwähnten "Enhancer" Sequenzen, funktionell verknüpft mit dem Promotor, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren.

**[0034]** Die erfindungsgemässen Nukleinsäuren können in einer oder mehreren Kopien im Konstrukt enthalten sein. Im Konstrukt können noch weitere Marker, wie Antibiotikaresistenzen oder Auxotrophien komplementierende Gene, gegebenenfalls zur Selektion auf das Konstrukt enthalten sein.

**[0035]** Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemässe Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, rhaP(rhaPBAD) SP6-, lambda-PR- oder im lambda-P-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SP02, in den Hefe-oder Pilzpromotoren ADC1, MFalpha, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH enthalten.

**[0036]** Es können auch künstliche Promotoren für die Regulation verwendet werden.

**[0037]** Das Nukleinsäurekonstrukt wird zur Expression in einem Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen Vektor, wie beispielsweise einem Plasmid oder einem Phagen inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Unter Vektoren sind ausser Plasmiden und Phagen auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, also z. B. Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS- Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA, sowie das Agrobacterium-System zu verstehen.

**[0038]** Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden. Diese Vektoren stellen eine weitere Ausgestaltung der Erfindung dar. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pKK223-3, pDHE19.2, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III"3-B1, tgt11 oder pBdCl, in StreptomycespIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2alpha, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLye23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHIac+, pBIN19, pAK2004 oder pDH51. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

**[0039]** Vorteilhafterweise enthält das Nukleinsäurekonstrukt zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3'- und/oder 5'-terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

**[0040]** Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

**[0041]** Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation mög-

lich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

**[0042]** In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann der das erfindungsgemässe-Nukleinsäurekonstrukt oder die erfindungsgemässe Nukleinsäure enthaltende Vektor auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Mikroorganismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Vektor wie einem Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt oder der erfindungsgemässen Nukleinsäure bestehen.

**[0043]** Für eine optimale Expression heterologer Gene in Organismen ist es vorteilhaft die Nukleinsäuresequenzen entsprechend des im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" zu verändern. Der "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

**[0044]** Die Herstellung einer erfindungsgemässen Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten kodierenden Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E. F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T. J. Silhavy, M. L. Berman und L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

**[0045]** Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden.

**[0046]** Mit Hilfe der erfindungsgemässen Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemässen Vektor transformiert sind und zur Produktion der erfindungsgemässen Polypeptide eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemässen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, oder Sambrook et al. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

**[0047]** Erfindungsgemäss sind auch homolog rekombinierte Mikroorganismen herstellbar. Dazu wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines erfindungsgemässen Gens oder einer kodierenden Sequenz enthält, worin gegebenenfalls wenigstens eine Aminosäure-Deletion, -Addition oder -Substitution eingebracht worden ist, um die erfindungsgemässe Sequenz zu verändern, z. B. funktionell zu disruptieren ("Knock-out"- Vektor). Die eingebrachte Sequenz kann z. B. auch ein Homologes aus einem verwandten Mikroorganismus sein oder aus einer Säugetier-, Hefe- oder Insektenquelle abgeleitet sein. Der zur homologen Rekombination verwendete Vektor kann alternativ derart ausgestaltet sein, dass das endogene Gen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert ist, jedoch noch das funktionelle Protein kodiert (z. B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich derart verändert sein, dass dadurch die Expression des endogenen Proteins verändert wird). Der veränderte Abschnitt des erfindungsgemässen Gens ist im homologen Rekombinationsvektor. Die Konstruktion geeigneter Vektoren zur homologen Rekombination ist z. B. beschrieben in Thomas, K. R. und Capecchi, M. R. (1987) *Cell* 51 : 503.

**[0048]** Als rekombinante Wirtsorganismen für die erfindungsgemässe Nukleinsäure oder dem Nukleinsäurekonstrukt kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen in Frage. Vorteilhafterweise werden als Wirtsorganismen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze oder Hefen verwendet. Vorteilhaft werden gram-positive oder gram-negative Bakterien, bevorzugt Bakterien der Familien Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Streptomycetaceae oder Nocardiaceae, besonders bevorzugt Bakterien der Gattungen *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Burkholderia*, *Salmonella*, *Agrobacterium* oder *Rhodococcus* verwendet.

**[0049]** Die im erfindungsgemässen Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0 C und 100 C, bevorzugt zwischen 10 C bis 60 C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten werden, das heisst während der Anzucht reguliert werden oder nicht. Die Anzucht kann "batch"-weise, "semi batch"-weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nachgefüttert werden. Die Enzyme können nach dem in den Beispielen beschriebenen Verfahren aus den Organismen isoliert werden oder als Rohextrakt für die Reaktion verwendet werden.

**[0050]** Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung erfindungsgemäse Polypeptide oder funktioneller, biologisch aktiver Fragmente davon, wobei man einen Polypeptide-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Polypeptide induziert und diese aus der Kultur isoliert. Die Polypeptide können so auch in grosstechnischem Massstab produziert werden, falls dies erwünscht ist. Der rekombinante Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

**[0051]** Die Zellen werden dann, falls die Polypeptide nicht in das Kulturmedium sezerniert werden, aufgeschlossen und das Produkt nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z. B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

**[0052]** Eine Aufreinigung der Polypeptide kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q- Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F. G., *Biochemische Arbeitsmethoden*, Verlag Water de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., *Protein Purification*, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

**[0053]** Vorteilhaft kann es sein, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren, die z. B. einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z. B. die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, *Antibodies A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor (N. Y.) Press). Weitere geeignete Tags sind z.B. HA, Calmodulin-BD, GST, MBD; Chitin-BD, Steptavidin-BD-Avi-Tag, Flag-Tag, T7 etc. Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z. B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann. Die entsprechenden Reinigungsprotokolle sind von den kommerziellen Affinitäts-Tag-Anbietern erhältlich.

**[0054]** Viele Hydrophobin-beschichtete pilzliche Oberflächen (Sporen, Fruchtkörper, Myzel) zeigen mikroskopisch nachweisbare, charakteristische Strukturen, sogenannte Rodlets. Ähnliche Rodlets mit einer Stärke von ca. 10 nm können auch auf mit Hydrophobin beschichteten hydrophilen Oberflächen (z.B. Glas, Glimmer etc.) nachgewiesen werden (Wösten et al., 1993, *Plant Cell*, 5, 1567-1574).

**[0055]** Aufgrund der außergewöhnlichen Eigenschaften von Hydrophobinen zur Beschichtung von Oberflächen (z.B. widerstandsfähig gegenüber Detergentien wie z.B. 1 %iger SDS Lösung) besitzen diese Proteine ein hohes Potential für zahlreiche technische Anwendungen. In verschiedenen Patentschriften sind Beispiele für derartige Anwendungen benannt, auf die hiermit hinsichtlich der Anwendung von Hydrophobinen Bezug genommen wird.

Nr.	Prio	Anmelder
WO 03/10331	23.07.2001	Applied Nanosystems B.V.
WO 04/00880	21.06.2002	Applied Nanosystems B.V.
WO 03/84508	04.04.2002	Applied Nanosystems B.V.
WO 00/40968	05.01.1999	Unilever N.V. (Hindustan Lever Ltd.)
EP-B 1 252 516	04.02.2000	Applied Nanosystems B.V. Stichting voor de Technische Wetenschappen
EP-B 1257 571	04.02.2000	Applied Nanosystems B.V.
WO 01/57066	04.02.2000	Applied Nanosystems B.V.
WO 03/10331	23.07.2001	Applied Nanosystems B.V.
WO 03/53383	14.12.2001	L'Oreal

**[0056]** Die technische Nutzung von Hydrophobinen, insbesondere solchen der Klasse I scheiterte bislang an einer effizienten Herstellungs- und Reinigungsmethode. Die bisher beschriebenen Verfahren, ausgehend von natürlichen Quellen (Sporen, Pilzmyzel etc.) führen nur zu Materialmengen im mg-Maßstab. (z.B. WO 96/41882).

**[0057]** Ebenso erwiesen sich Ansätze über eine rekombinante Herstellung in verschiedenen Produktionsorganismen als äußerst aufwendig und wenig zufriedenstellend.

**[0058]** Die erfindungsgemässen Hydrophobin-Proteine besitzen sowohl in ihrer fusionierten Form, d.h. zusammen mit dem Fusionspartnerteil, als auch in isolierter Form die wünschenswerten Eigenschaften von Hydrophobinen. Man kann also die erfindungsgemässen Proteine sowohl direkt als Fusionsproteine als auch nach Abspaltung und Abtrennung des Fusionspartners als „reine“ Hydrophobine verwenden.

**[0059]** Wenn eine Abtrennung des Fusionspartners vorgesehen ist, empfiehlt es sich eine potentielle Spaltstelle (spezifische Erkennungsstelle für Proteasen) in das Fusionsprotein zwischen Hydrophobinteil und Fusionspartnerteil einzubauen. Als Spaltstelle geeignet sind insbesondere solche Peptidsequenzen geeignet, die ansonsten weder im Hydrophobinteil noch im Fusionspartnerteil vorkommen, was sich mit bioinformatischen Tools leicht ermitteln lässt. Besonders geeignet sind beispielsweise BrCN-Spaltung an Methionin, oder durch Protease vermittelte Spaltung mit Faktor Xa-, Enterokinase-, Thrombin, TEV-Spaltung (Tobacco etch virus Protease).

#### Experimenteller Teil

##### Beispiel 1

##### Vorarbeiten für die Klonierung von yaad-His<sub>6</sub>/yaaE-His<sub>6</sub>

**[0060]** Mit Hilfe der Oligonukleotide Hal570 und Hal571 (Hal 572/ Hal 573) wurde eine Polymerase Kettenreaktion durchgeführt. Als Template DNA wurde genomische DNA des Bakteriums Bacillus subtilis verwendet. Das erhaltene PCR Fragment enthielt die codierende Sequenz des Gens yaaD/yaaE aus Bacillus subtilis, und an den Enden je eine NcoI bzw. BglII Restriktionsschnittstelle. Das PCR Fragment wurde gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und BglII geschnitten. Dieses DNA Fragment wurde als Insert verwendet, und in den zuvor mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und BglII linearisierten Vektor pQE60 der Firma Qiagen kloniert. Die so entstandenen Vektoren pQE60YAAD#2/pQE60YaaE#5 können zur Expression von Proteinen bestehend aus, YAAD::HIS<sub>6</sub> bzw. YAAE::HIS<sub>6</sub> verwendet werden.

Hal570: gcgcgcccatggctcaaacagggtactga

Hal571: gcagatctccagccggttcttcatac

Hal572: ggccatgggattaacaataggtgtactagg

Hal573: gcagatctacaagtgccctttgcttatattcc

## Beispiel 2

Klonierung von yaad-Hydrophobin DewA-His<sub>6</sub>

**[0061]** Mit Hilfe der Oligonukleotide KaM 416 und KaM 417 wurde eine Polymerase Kettenreaktion durchgeführt. Als Template DNA wurde genomische DNA des Schimmelpilzes *Aspergillus nidulans* verwendet. Das erhaltene PCR Fragment enthielt die codierende Sequenz des Hydrophobin Gens *dewA* und einer N-Terminale Faktor Xa Proteinase Schnittstelle. Das PCR Fragment wurde gereinigt und mit der Restriktionsendonuklease BamHI geschnitten. Dieses DNA Fragment wurde als Insert verwendet, und in den zuvor mit der Restriktionsendonuklease BglII linearisierten Vektor pQE60YAAD#2 kloniert.

**[0062]** Der so entstandene Vektor #508 kann zur Expressions eines Fusionsproteins bestehend aus, YAAD::Xa::*dewA*::His<sub>6</sub> verwendet werden.

KaM416: GCAGCCCATCAGGGATCCCTCAGCCTTGGTACCAGCGC

KaM417: CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCGTCTCCGC

## Beispiel 3

Klonierung von yaad-Hydrophobin RodA-His<sub>6</sub>

**[0063]** Die Klonierung des Plasmids #513 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung der Oligonukleotide KaM 434 und KaM 435.

KaM434: GCTAAGCGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCATTGCTGC

KaM435: CCAATGGGGATCCGAGGATGGAGCCAAGGG

## Beispiel 4

Klonierung von yaad-Hydrophobin BASF1-His<sub>6</sub>

**[0064]** Die Klonierung des Plasmids #507 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung der Oligonukleotide KaM 417 und KaM 418.

**[0065]** Als Template DNA wurde eine künstlich synthetisierte DNA Sequenz – Hydrophobin BASF1 -eingesetzt (siehe Anhang).

KaM417: CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCGTCTCCGC

KaM418: CTGCCATTCAGGGGATCCCATATGGAGGAGGGAGACAG

## Beispiel 5

Klonierung von yaad-Hydrophobin BASF2-His<sub>6</sub>

**[0066]** Die Klonierung des Plasmids #506 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung der Oligonukleotide KaM 417 und KaM 418.

**[0067]** Als Template DNA wurde eine künstlich synthetisierte DNA Sequenz – Hydrophobin BASF2 -eingesetzt (siehe Anhang).

KaM417:000GTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCGTCTCCGC

KaM418: CTGCCATTCAGGGGATCCCATATGGAGGAGGGAGACAG

## Beispiel 6

Klonierung von yaad-Hydrophobin SC3-His<sub>6</sub>

**[0068]** Die Klonierung des Plasmids #526 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung der Oligonukleotide KaM464 und KaM465.

**[0069]** Als Template DNA wurde cDNA von *Schizophyllum commune* eingesetzt (siehe Anhang).

KaM464: CGTTAAGGATCCGAGGATGTTGATGGGGGTGC  
 KaM465: GCTAACAGATCTATGTTTCGCCCGTCTCCCCGTCGT

#### Beispiel 7

Fermentation des rekombinanten E.coli Stammes yaad-Hydrophobin DewA-His<sub>6</sub>

**[0070]** Inokulation von 3ml LB Flüssigmedium mit einem yaad-Hydrophobin DewA-His<sub>6</sub> exprimierenden E.coli Stamm in 15ml Greiner Röhrchen. Inkubation für 8h bei 37°C auf einem Schüttler mit 200 UpM. Je 2 l Erlenmeyer Kolben mit Schikanen und 250ml LB Medium (+ 100µg/ml Ampicillin) werden mit jeweils 1 ml der Vorkultur angeimpft und 9h bei 37°C auf einem Schüttler mit 180 UpM inkubiert.

**[0071]** 13.5l LB-Medium (+100µg/ml Ampicillin) in einem 20l Fermenter mit 0,5l Vorkultur (OD<sub>600nm</sub> 1:10 gegen H<sub>2</sub>O gemessen) animpfen. Bei einer OD<sub>600nm</sub> von ~3.5 Zugabe von 140ml 100mM IPTG. Nach 3h Fermenter auf 10°C abkühlen und Fermentationsbrühe abzentrifugieren. Zellpellet zur weiteren Aufreinigung verwenden.

#### Beispiel 8

Reinigung des rekombinanten Hydrophobin-Fusionsproteins

(Reinigung von Hydrophobin-Fusionsproteinen, die ein C-terminales His<sub>6</sub>-tag besitzen)

**[0072]** 100 g Zellpellet (100 – 500 mg Hydrophobin) werden mit 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 auf 200 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und resuspendiert. Die Suspension wird mit einem Ultraturax Typ T25 (Janke und Kunkel; IKA-Labortechnik) für 10 Minuten behandelt und anschliessend für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 500 Einheiten Benzonase (Merck, Darmstadt; Best.-Nr. 1.01697.0001) zum Abbau der Nukleinsäuren inkubiert. Vor dem Zellaufschluss wird mit einer Glaskartusche (P1) filtriert. Zum Zellaufschluss und für das Scheren der restlichen genomischen DNA werden zwei Homogenisatorläufe bei 1.500 bar durchgeführt (Microfluidizer M-110EH; Microfluidics Corp.). Das Homogenisat wird zentrifugiert (Sorvall RC-5B, GSA-Rotor, 250 ml Zentrifugenbecher, 60 Minuten, 4°C, 12.000 Upm, 23.000 g), der Überstand auf Eis gestellt und das Pellet in 100 ml Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 resuspendiert. Zentrifugation und Resuspendieren werden dreimal wiederholt, wobei der Natriumphosphatpuffer bei der dritten Wiederholung 1 % SDS enthält. Nach der Resuspension wird für eine Stunde gerührt und eine abschliessende Zentrifugation durchgeführt (Sorvall RC-5B, GSA-Rotor, 250 ml Zentrifugenbecher, 60 Minuten, 4°C, 12.000 Upm, 23.000 g). Gemäß SDS-PAGE Analyse ist das Hydrophobin nach der abschliessenden Zentrifugation im Überstand enthalten ([Abb. 1](#)). Die Versuche zeigen, dass das Hydrophobin wahrscheinlich in Form von Einschlusskörpern in den entsprechenden E.coli Zellen enthalten ist. 50 ml des Hydrophobin-enhaltenden Überstandes werden auf eine 50 ml Nickel-Sepharose High Performance 17-5268-02 Säule aufgetragen (Amersham), die mit 50 mM Tris-Cl pH 8,0 Puffer equilibriert wurde. Die Säule wird mit 50 mM Tris-Cl pH 8,0 Puffer gewaschen und das Hydrophobin anschliessend mit 50 mM Tris-Cl pH 8,0 Puffer, der 200 mM Imidazol enthält, eluiert. Zur Entfernung des Imidazols wird die Lösung gegen 50 mM Tris-Cl pH 8,0 Puffer dialysiert.

**[0073]** [Abb. 1](#) zeigt die Reinigung des erfindungsgemässen Hydrophobins:

Spur 1: Auftrag Nickel-Sepharose Säule (1:10 Verdünnung)

Spur 2: Durchlauf = Eluat Waschschrift

Spuren 3–5: OD 280 Maxima der Elutionsfraktionen

**[0074]** Das erfindungsgemässe Hydrophobin der [Abb. 1](#) besitzt ein Molekulargewicht von ca. 53 kD. Die kleineren Banden repräsentieren zum Teil Abbauprodukte des Hydrophobins.

#### Beispiel 9

Beschichtung/Evaluierung von Oberflächen mit Hydrophobin

**[0075]** Die Evaluierung der Beschichtungseigenschaften von Hydrophobin bzw. Hydrophobinfusionsprotein wird bevorzugt auf Glas bzw. Teflon als Modelle für eine hydrophile bzw. hydrophobe Oberflächen vorgenommen.

## Standard-Versuche für Beschichtung

## Glas:

- Konzentration Hydrophobin: 1–100 µg/mL
- Inkubation von Glasplättchen über Nacht (Temperatur: 80°C) in 50mM Na-Acetat pH 4 + 0,1 % Tween 20
- nach Beschichtung waschen in VE-Wasser
- danach Inkubation 10min/80°C/1 % SDS
- waschen in VE-Wasser

## Teflon:

- Konzentration: 1–100 µg/mL
- Inkubation von Teflonplättchen über Nacht (Temperatur: 80°C) in 10mM Tris pH 8
- nach Beschichtung waschen in VE-Wasser
- Inkubation 10min/80°C/0,1 % Tween 20
- waschen in VE-Wasser
- danach Inkubation 10min/80°C/1% SDS
- waschen in VE-Wasser

**[0076]** Die Proben werden an der Luft getrocknet und der Kontaktwinkel (in Grad) eines Tropfens von 5 µl Wasser bestimmt. Es ergeben sich z.B. folgende Werte:

Ansatz mit yaad-DewA Fusionsprotein gemäss Beispiel 8 (Kontrolle: ohne Protein; yaad-dewA-his<sub>6</sub>: 100 µg/ml gereinigter Fusionspartner):

	nach 1%SDS 80°C	
	Teflon	Glas
Kontrolle	96,8	30
yaad	97,4	38,7
100 µg/ml	77,7	76,8
50 µg/ml	85,9	77,9
10 µg/ml	83,5	74,5
5 µg/ml	104	70,3
1 µg/ml	104,9	73

## Beispiel 10

## Beschichtung/Evaluierung von Oberflächen mit Hydrophobin

## Glas (Fensterglas, Süddeutsche Glas, Mannheim):

- Konzentration Hydrophobin: 100 µg/mL
- Inkubation von Glasplättchen über Nacht (Temperatur 80°C) in 50mM Na-Acetat pH 4 + 0,1 % Tween 20
- nach Beschichtung waschen in destilliertem Wasser
- danach Inkubation 10min/80°C/1 % SDS-Lösung in dest. Wasser
- waschen in dest. Wasser

**[0077]** Die Proben werden an der Luft getrocknet und der Kontaktwinkel (in Grad) eines Tropfens von 5 µl Wasser bestimmt.

**[0078]** Die Kontaktwinkelmessung wurde auf einem Gerät Dataphysics Contact Angle System OCA 15+, Software SCA 20.2.0. (November 2002) bestimmt. Die Messung erfolgte gemäss den Herstellerangaben.

**[0079]** Unbehandeltes Glas ergab einen Kontaktwinkel von  $30 \pm 5^\circ$ ; eine Beschichtung mit einem funktionellen Hydrophobin gemäss Beispiel 8 (yaad-dewA-his<sub>6</sub>) ergab Kontaktwinkel von  $75 \pm 5^\circ$ .

Zuordnung der Sequenznamen zu DNA- und Polypeptidsequenzen im Sequenzprotokoll

dewA DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 1
dewA Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 2
rodA DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 3
rodA Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 4
hypA DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 5
hypA Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 6
hypB DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 7

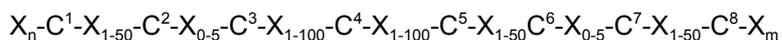
hypB Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 8
sc3 DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 9
sc3 Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 10
basf1 DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 11
basf1 Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 12
basf2 DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 13
basf2 Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 14
yaad DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 15
yaad Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 16
yaae DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 17
yaae Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 18
yaad-Xa-dewA-his DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 19
yaad-Xa-dewA-his Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 20
yaad-Xa-rodA-his DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 21
yaad-Xa-rodA-his Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 22
yaad-Xa-basf1-his DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 23
yaad-Xa-basf1-his Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 24

**Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.**

**Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.**

### Patentansprüche

1. Polypeptide der allgemeinen Strukturformel (I)



wobei X für jede der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren steht,

n und m für Zahlen zwischen 0 und 500 stehen,  
C für Cystein steht,

mit der Maßgabe, dass wenigstens eine der mit  $X_n$  oder  $X_m$  abgekürzten Peptidsequenzen für eine mindestens 20 Aminosäuren lange Peptidsequenz steht, die natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpft ist, die nach Beschichten einer Glasoberfläche eine Kontaktwinkeländerung von mindestens  $20^\circ$  bewirken.

2. Polypeptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Strukturformel (I) ein Hydrophobin der Klasse I umfasst.

3. Polypeptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Strukturformel (I) ein Hydrophobin umfasst, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die von *dewA*, *rodA*, *sc3*, *hypA*, *hypB*, *basf1*, *basf2* gebildet wird.

4. Polypeptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Strukturformel (I) eine Sequenz ausgewählt aus SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 umfasst.

5. Polypeptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass  $X_n$  oder  $X_m$  eine polypeptidsequenz ausgewählt aus SEQ ID NO: 16, 18 umfasst.

6. Polypeptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass  $X_n$  oder  $X_m$  für eine Sequenz  $(\text{His})_{4-10}$  steht.

7. Polypeptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Strukturformel (I) Polypeptide ausgewählt aus der Gruppe SEQ ID NO: 20, 22, 24 umfasst.

8. Nukleinsäure, codierend für Polypeptide gemäß Anspruch 1-7.

9. Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden gemäß Anspruch 1-7, indem man eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 8 in einem Wirtsorganismus exprimiert und das so erhaltene Protein ggf. nach Aufreinigung isoliert.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Wirtsorganismus *E.coli* verwendet wird.

11. Verwendung von Hydrophobinen gemäß Anspruch 1-7 zur Beschichtung von Oberflächen.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Abbildung 1

