



(11) **EP 1 893 675 B9**

(12) **KORRIGIERTE EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(15) Korrekturinformation:  
**Korrigierte Fassung Nr. 1 (W1 B1)**  
**Korrekturen, siehe**  
**Beschreibung Abschnitt(e) 96**

(51) Int Cl.:  
**C08J 9/224** (2006.01)

(86) Internationale Anmeldenummer:  
**PCT/EP2006/063037**

(48) Corrigendum ausgegeben am:  
**09.09.2009 Patentblatt 2009/37**

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:  
**WO 2006/131555 (14.12.2006 Gazette 2006/50)**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des  
Hinweises auf die Patenterteilung:  
**01.10.2008 Patentblatt 2008/40**

(21) Anmeldenummer: **06763606.8**

(22) Anmeldetag: **09.06.2006**

(54) **HYDROPHOBIN ALS BESCHICHTUNGSMITTEL FÜR EXPANDIERBARE ODER EXPANDIERTE, THERMOPLASTISCHE POLYMERPARTIKEL**

HYDROPHOBIN AS A COATING AGENT FOR EXPANDABLE OR EXPANDED THERMOPLASTIC POLYMER PARTICLES

HYDROPHOBINE UTILISEE EN TANT QUE SUBSTANCE DE REVETEMENT POUR DES PARTICULES POLYMERES THERMOPLASTIQUES EXPANSIBLES OU EXPANSEES

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR**  
**HU IE IS IT LI LT LU LV MC NL PL PT RO SE SI**  
**SK TR**

(30) Priorität: **10.06.2005 DE 102005027039**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**05.03.2008 Patentblatt 2008/10**

(73) Patentinhaber: **BASF SE**  
**67056 Ludwigshafen (DE)**

(72) Erfinder:  
• **EXNER, Christian**  
**67433 Neustadt (DE)**

- **BAUS, Ulf**  
**69221 Dossenheim (DE)**
- **HOLOCH, Jan**  
**69181 Leimen (DE)**
- **BOLLSCHWEILER, Claus**  
**69118 Heidelberg (DE)**
- **SUBKOWSKI, Thomas**  
**68526 Ladenburg (DE)**
- **KAROS, Marvin**  
**68723 Schwetzingen (DE)**
- **LEMAIRE, Hans-Georg**  
**67117 Limburgerhof (DE)**

(56) Entgegenhaltungen:  
**EP-A2- 0 470 455** **WO-A2-20/05033316**

**EP 1 893 675 B9**

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel mit einer Beschichtung enthaltend Hydrophobin, sowie Verfahren zu deren Herstellung.

[0002] Um die störungsfrei Förderung von expandierbarem Polystyrol zu ermöglichen und die elektrostatische Aufladung der vorgeschäumten Polystyrolschaumpartikel zu vermindern, wird in der Regel eine Beschichtung der EPS-Partikel mit einem Antistatikum verwendet. Abrieb oder Abwaschung des Beschichtungsmittels von der Oberfläche der Partikel führt häufig zu nicht zufriedenstellenden antistatischen Eigenschaften. Des weiteren kann die Beschichtung mit dem Antistatikum zur Verklebung der Partikel und schlechtem Rieserverhalten führen.

[0003] Die EP-A 470 455 beschreibt perlformige antistatische expandierbare Styrolpolymerisate mit einer Beschichtung aus einem quartärnären Ammoniumsalz und feinteiliger Kieselsäure, die sich durch ein gutes Rieserverhalten auszeichnen.

[0004] Hydrophobine sind kleine Proteine von etwa 100 bis 150 Aminosäuren, die charakteristisch für filamentöse Pilze, beispielsweise *Schizophyllum commune*, sind. Sie weisen in aller Regel 8 Cystein-Einheiten auf.

[0005] Hydrophobine weisen eine ausgeprägte Affinität zu Grenzflächen auf und eignen sich daher zur Beschichtung von Oberflächen. So lässt sich beispielsweise Teflon mittels Hydrophobinen unter Erhalt einer hydrophilen Oberfläche beschichten.

[0006] Hydrophobine können aus natürlichen Quellen isoliert werden. Unsere ältere Anmeldung DE 102005007480.4 offenbart ein Herstellverfahren für Hydrophobine.

[0007] Im Stand der Technik ist die Verwendung von Hydrophobinen für verschiedene Anwendungen vorgeschlagen worden.

[0008] WO 96/41882 schlägt die Verwendung von Hydrophobinen als Emulgatoren, Verdicker, oberflächenaktive Substanzen, zum Hydrophilieren hydrophober Oberflächen, zur Verbesserung der Wasserbeständigkeit hydrophiler Substrate, zur Herstellung von Öl-in-Wasser-Emulsionen oder von Wasser-in-Öl-Emulsionen vor. Weiterhin werden pharmazeutische Anwendungen wie die Herstellung von Salben oder Cremes sowie kosmetische Anwendungen wie Hautschutz oder die Herstellung von Haarshampoos oder Haarspülungen vorgeschlagen.

[0009] WO 01/57528 offenbart die Beschichtung von Fenstern, Kontaktlinsen, Biosensoren, medizinischen Vorrichtungen, Behältern zur Durchführung von Versuchen oder zur Lagerung, Schiffrümpfen, festen Teilchen oder Rahmen oder Karosserie von Personenkraftwagen mit einer Hydrophobine enthaltenden Lösung bei einer Temperatur von 30 bis 80°C.

[0010] WO 03/53383 offenbart die Verwendung von Hydrophobin zum Behandeln von Keratin-Materialien in kosmetischen Anwendungen.

[0011] WO 03/10331 offenbart einen mit Hydrophobin beschichteten Sensor, beispielsweise eine Messelektrode, an den nicht kovalent weitere Substanzen, z.B. elektroaktive Substanzen, Antikörper oder Enzyme gebunden sind.

[0012] Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher den genannten Nachteilen abzuweichen und ein antistatisches Beschichtungsmittel für expandierbare oder expandierte thermoplastische Polymerpartikel zu finden, das beim Vorschäumen oder beim Verschäumen zu niedrigeren Dichten eine verringerte Neigung zum Verkleben der Partikel zeigt.

[0013] Demgemäß wurden die oben genannten expandierbaren oder expandierten, thermoplastische Polymer-Partikel gefunden.

[0014] Bevorzugt enthält die Beschichtung 1 bis 5000 ppm, insbesondere 10 bis 1000 ppm Hydrophobin, bezogen auf das thermoplastische Polymer. Die Beschichtung kann weitere Antistatika und/oder Beschichtungshilfstoffe enthalten oder auf weiteren Beschichtungen mit anderen Beschichtungsmitteln aufgebracht werden. Besonders bevorzugt wird eine Beschichtung, die nur aus Hydrophobin oder Mischungen von Hydrophobin besteht und eine mono-molekulare Schicht auf den expandierbaren oder expandierten thermoplastischen Polymer-Partikel ausbildet.

[0015] Für die expandierbaren oder expandierten, thermoplastischen Polymer-Partikel werden bevorzugt Styrolpolymere, wie Polystyrol (EPS) oder Polyolefine, wie Polyethylen (EPE) oder Polypropylen (EPP) verwendet.

[0016] Expandierbare thermoplastische Polymer-Partikel sind solche, die durch z. B. mit Heißluft oder Wasserdampf zu expandierten, thermoplastischen Polymer-Partikel verschäumbar sind. Sie enthalten in der Regel chemische oder physikalische Treibmittel in Mengen von 2 bis 10 Gew.-%, bevorzugt 3 bis 7 Gew.-% bezogen auf das thermoplastische Polymer.

[0017] Bevorzugte physikalische Treibmittel sind Gase, wie Stickstoff oder Kohlendioxid oder aliphatische Kohlenwasserstoffe mit 2 bis 7 Kohlenstoffatomen, Alkohole, Ketone, Ether oder halogenierte Kohlenwasserstoffe. Besonders bevorzugt werden iso-Butan, n-Butan, iso-Pentan, n-Pentan, neo-Pentan, Hexan oder Gemische davon eingesetzt.

[0018] Des weiteren können die expandierbaren und expandierten thermoplastischen Polymer-Partikel übliche Hilfstoffe, wie Farbstoffe, Pigmente, Füllstoffe, IR-Absorber, wie Ruß, Aluminium oder Graphit, Stabilisatoren, Flammenschutzmittel, wie Hexabromcyclododecan (HBCD), Flammschutzsynergisten, wie Dicumyl oder Dicumylperoxid, Keimbildner oder Gleitmittel in wirksamen Mengen enthalten.

[0019] Die erfindungsgemäßen, expandierbaren thermoplastischen Polymer-Partikel können je nach Herstellverfahren

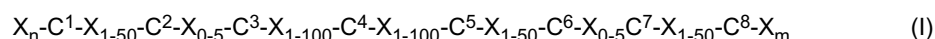
kugel- bzw. perlförmig oder zylinderförmig sein und weisen in der Regel einen mittleren Teilchendurchmesser im Bereich von 0,05 bis 5 mm, insbesondere 0,3 bis 2,5 mm auf, die gegebenenfalls durch Siebung in einzelne Fraktionen aufgeteilt werden können.

**[0020]** Die expandierten thermoplastischen Polymer-Partikel haben entsprechend dem Expansionsgrad mittlere Teilchendurchmesser im Bereich von 1 bis 10 mm, insbesondere 2 bis 6 mm und eine Dichte im Bereich von 10 bis 200 kg/m<sup>3</sup>.

**[0021]** Die expandierbaren thermoplastischen Polymer-Partikel können beispielsweise durch Druckimprägnierung von thermoplastischen Polymer-Partikeln mit Treibmitteln in einem Kessel, durch Suspensionspolymerisation in Gegenwart von Treibmitteln oder durch Schmelzeimprägnierung in einem Extruder oder statischen Mischer und anschließende Druckunterwassergranulierung erhalten werden.

**[0022]** Expandierte thermoplastische Polymerpartikel können durch Verschäumen von expandierbaren thermoplastischen Polymer-Partikeln, z. B. mit Heißluft oder Wasserdampf in Druckvorschäumern, durch Druckimprägnierung von thermoplastischen Polymerpartikeln mit Treibmitteln in einem Kessel und anschließendem Entspannen oder durch Schmelzeextrusion einer treibmittelhaltigen Schmelze unter Aufschäumen und anschließender Granulierung.

**[0023]** Unter dem Begriff "Hydrophobine" im Sinne dieser Erfindung sollen im Folgenden Proteine der allgemeinen Strukturformel (I)

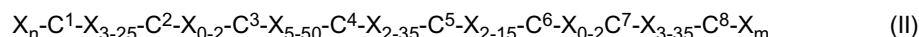


verstanden werden, wobei X für jede der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren (Phe, Leu, Ser, Tyr, Cys, Trp, Pro, His, Gln, Arg, Ile Met, Thr, Asn, Lys, Val, Ala, Asp, Glu, Gly) stehen kann. Dabei können X jeweils gleich oder verschieden sein. Hierbei stellen die bei X stehenden Indizes jeweils die Anzahl der Aminosäuren dar, C steht für Cystein, und die Indizes n und m stehen unabhängig voneinander für natürliche Zahlen von 0 und 500, bevorzugt von 15 bis 300.

**[0024]** Die Polypeptide gemäß Formel (I) sind weiterhin durch die Eigenschaft charakterisiert, dass sie bei Raumtemperatur nach Beschichten einer Glasoberfläche eine Vergrößerung des Kontaktwinkels eines Wassertropfens von mindestens 20°, bevorzugt mindestens 25° und besonders bevorzugt 30° bewirken, jeweils verglichen mit dem Kontaktwinkel eines gleich großen Wassertropfens mit der unbeschichteten Glasoberfläche.

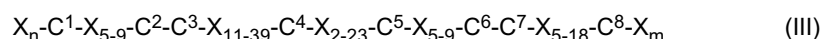
**[0025]** Die mit C<sup>1</sup> bis C<sup>8</sup> benannten Cysteine können entweder reduziert vorliegen oder miteinander Disulfidbrücken ausbilden. Besonders bevorzugt ist die intramolekulare Ausbildung von C-C Brücken, insbesondere die mit mindestens einer, bevorzugt 2, besonders bevorzugt 3 und ganz besonders bevorzugt 4 intramolekularen Disulfidbrücken.

**[0026]** Bevorzugt werden Hydrophobine der allgemeinen Formel (II)



zur Ausführung der vorliegenden Erfindung eingesetzt, wobei X, C und die bei X und C stehenden Indizes die obige Bedeutung haben, jedoch stehen die Indizes n und m für Zahlen zwischen 0 und 300, und sich die Proteine weiterhin durch die oben erwähnte Kontaktwinkeländerung auszeichnen.

**[0027]** Besonders bevorzugt werden Hydrophobine der allgemeinen Formel (III)



eingesetzt, wobei X, C und die bei X und C stehenden Indizes die obige Bedeutung haben, die Indizes n und m für Zahlen zwischen 0 und 200 stehen, und sich die Proteine weiterhin durch die oben erwähnte Kontaktwinkeländerung auszeichnen.

**[0028]** Bei den Resten X<sub>n</sub> und X<sub>m</sub> kann es sich um Peptidsequenzen handeln, die natürlicherweise mit einem Hydrophobin verknüpft sind. Es kann sich aber auch bei einem oder beiden Resten um Peptidsequenzen handeln, die natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpft sind. Darunter sind auch solche Reste X<sub>n</sub> und/oder X<sub>m</sub> zu verstehen, bei denen eine natürlicherweise in einem Hydrophobin vorkommende Peptidsequenz durch eine nicht natürlicherweise in einem Hydrophobin vorkommende Peptidsequenz verlängert ist.

**[0029]** Falls es sich bei X<sub>n</sub> und/oder X<sub>m</sub> um natürlicherweise nicht mit Hydrophobinen verknüpfte Peptidsequenzen handelt, sind derartige Sequenzen in der Regel mindestens 20, bevorzugt mindestens 35, besonders bevorzugt mindestens 50 und ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Aminosäuren lang. Ein derartiger, natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpfter Rest soll im Folgenden auch als Fusionspartner bezeichnet werden. Damit soll ausgedrückt werden, dass die Proteine aus mindestens einem Hydrophobinteil und einem Fusionspartner bestehen können, die in der Natur nicht zusammen in dieser Form vorkommen.

**[0030]** Der Fusionspartner kann aus einer Vielzahl von Proteinen ausgewählt werden. Es können auch mehrere Fusionspartner mit einem Hydrophobinteil verknüpft werden, beispielsweise am Aminoterminus (X<sub>n</sub>) und am Carboxyterminus (X<sub>m</sub>) des Hydrophobinteils. Es können aber auch beispielsweise zwei Fusionspartnerteile mit einer Position (X<sub>n</sub> oder X<sub>m</sub>) des erfindungsgemäßen Proteins verknüpft werden.

**[0031]** Besonders geeignete Fusionspartnerteile sind Proteine, die natürlicherweise in Mikroorganismen, insbesondere in *E. coli* oder *Bacillus subtilis* vorkommen. Beispiele für solche Fusionspartnerteile 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, wobei sich die Prozentangaben jeweils auf die Anzahl der Aminosäuren bezieht.

**[0032]** Die erfindungsgemäß verwendeten Proteine können auch noch in ihrer Polypeptidsequenz modifiziert sein, beispielsweise durch Glycosylierung, Acetylierung oder auch durch chemische Quervernetzung beispielsweise mit Glutaraldehyd.

**[0033]** Eine Eigenschaft der erfindungsgemäß verwendeten 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 Protein gemessen wird und die Differenz der beiden Messungen ermittelt wird.

**[0034]** Die Durchführung von Kontaktwinkelmessungen ist dem Fachmann prinzipiell bekannt. Die Messungen beziehen sich auf Raumtemperatur sowie Wassertropfen von 5  $\mu$ l. Die genauen experimentellen Bedingungen für eine beispielhaft geeignete Methode zur Messung des Kontaktwinkels sind im experimentellen Teil dargestellt. Unter den dort genannten Bedingungen besitzen die erfindungsgemäß verwendeten Proteine die Eigenschaft, den Kontaktwinkel um mindestens 20°, bevorzugt mindestens 25°, besonders bevorzugt mindestens 30° zu vergrößern, jeweils verglichen mit dem Kontaktwinkel eines gleich großen Wassertropfens mit der unbeschichteten Glasoberfläche.

**[0035]** 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).

**[0036]** Die assemblierten Membranen aus Klasse I Hydrophobinen sind hochgradig unlöslich (selbst gegenüber 1 % Na-Dodecylsulfat (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.

**[0037]** 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. Klasse II Hydrophobine weisen weiterhin mehr geladene Aminosäuren als Klasse I auf.

**[0038]** Besonders bevorzugte Hydrophobine zur Ausführung der vorliegenden Erfindung sind die Hydrophobine des Typs dewA, rodA, hypA, hypB, sc3, basf1, basf2, die im nachfolgenden Sequenzprotokoll strukturell charakterisiert sind. Es kann sich auch nur um Teile oder Derivate davon handeln. Es können auch mehrere Hydrophobinteile, 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.

**[0039]** Besonders geeignet zur Durchführung der vorliegenden Erfindung sind weiterhin die Fusionsproteine mit den 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 bereits beschriebene Vergrößerung des Kontaktwinkels um mindestens 20° verstanden.

**[0040]** Die erfindungsgemäß verwendeten Proteine lassen sich chemisch durch bekannte Verfahren der Peptidsynthese, beispielsweise durch Festphasensynthese nach Merrifield herstellen.

**[0041]** Natürlich vorkommende Hydrophobine lassen sich aus natürlichen Quellen mittels geeigneter Methoden isolieren. Beispielhaft sei auf Wösten et. al., Eur. J Cell Bio. 63, 122-129 (1994) oder WO 96/41882 verwiesen.

**[0042]** Die Herstellung von Fusionsproteinen kann bevorzugt durch gentechnische Verfahren erfolgen, 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. Ein derartiges Herstellverfahren ist in unserer älteren Anmeldung DE 102005007480.4 offenbart.

**[0043]** Geeignete Wirtsorganismen (Produktionsorganismen) für das genannte Herstellverfahren können dabei Prokaryonten (einschließlich der Archaea) oder Eukaryonten sein, besonders Bakterien einschliesslich Halobakterien 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.

**[0044]** Gegenstand der Erfindung ist außerdem die Verwendung von Expressionskonstrukten, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen, eine für ein erfindungsgemäß verwendetes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz, sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

**[0045]** Vorzugsweise umfassen eingesetzte 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.

**[0046]** Unter einer "operativen Verknüpfung" versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

**[0047]** 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).

**[0048]** 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.

**[0049]** Ein bevorzugtes Nukleinsäurekonstrukt enthält vorteilhaft 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.

**[0050]** Die 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.

**[0051]** Vorteilhafte Regulationssequenzen für das 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 vorteilhaft 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.

**[0052]** Es können auch künstliche Promotoren für die Regulation verwendet werden.

**[0053]** 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.

**[0054]** 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<sup>3</sup>-B1, tgt11 oder pBdCl, in Streptomyces pJ101, pJ364, pJ702 oder pJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2alpha, pAG-1, YE6, YE13 oder pEMBL YE23 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 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.

**[0055]** Vorteilhaft 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 Wirtsorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

**[0056]** 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.

**[0057]** 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 möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

**[0058]** In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann der das Nukleinsäurekonstrukt oder die Nukleinsäure enthaltende Vektor auch vorteilhaft 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 Nukleinsäure

bestehen.

**[0059]** 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.

**[0060]** Die Herstellung einer 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.

**[0061]** Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus, vorteilhaft 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.

**[0062]** Mit Hilfe der Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem Vektor transformiert sind und zur Produktion der erfindungsgemäß verwendeten Proteine eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen 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.

**[0063]** Es sind auch homolog rekombinierte Mikroorganismen herstellbar. Dazu wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines erfindungsgemäß zu verwendenden Gens oder einer kodierenden Sequenz enthält, worin gegebenenfalls wenigstens eine Aminosäure-Deletion, -Addition oder -Substitution eingebracht worden ist, um die Sequenz zu verändern, z. B. funktionell zu disruptieren ("Knockout"-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 erfindungsgemäß verwendeten 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.

**[0064]** Als rekombinante Wirtsorganismen für die erfindungsgemäß verwendete 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 grampositive 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.

**[0065]** Die im Herstellverfahren für Fusionsproteine 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- und Magnesiumsalze sowie gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0 und 100 °C, bevorzugt zwischen 10 bis 60 °C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH-Wert der Nährflüssigkeit auf einem 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.

**[0066]** Erfindungsgemäß verwendete Proteine oder funktionelle, biologisch aktive Fragmente davon, können mittels eines rekombinanten Verfahrens hergestellt werden, bei dem man einen Proteine-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Proteine induziert und diese aus der Kultur isoliert. Die Proteine 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 und J. Sambrook, *Molecular*

Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

**[0067]** Die Zellen werden dann, falls die erfindungsgemäß verwendeten Proteine 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.

**[0068]** Eine Aufreinigung der erfindungsgemäß verwendeten Proteine 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 Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

**[0069]** 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 Proteine oder Fusionsproteine kodieren, die beispielsweise einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen umfassen als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie beispielsweise 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, Streptavidin-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.

**[0070]** Die wie beschrieben hergestellten Proteine können sowohl direkt als Fusionsproteine als auch nach Abspaltung und Abtrennung des Fusionspartners als "reine" Hydrophobine verwendet werden.

**[0071]** 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).

**[0072]** Die Beschichtung der expandierbaren oder expandierten, thermoplastischen Polymer-Partikel kann vor oder nach dem Verschäumen, beispielsweise durch Auftrommeln von Hydrophobin in einem Schaufelmischer (Fa. Lödige) oder durch in Kontaktbringen der Oberfläche der Polymer-Partikel mit einer Hydrophobin-haltigen Lösung, beispielsweise durch Tauchen oder Sprühen, erfolgen. Bei der Herstellung durch Extrusion einer treibmittelhaltigen Schmelze kann das Hydrophobin auch dem Wasserkreislauf des Unterwassergranulators zugegeben werden.

**[0073]** Bevorzugt wird zur Beschichtung der expandierbaren oder expandierten, thermoplastischen Polymer-Partikel eine wässrige Lösung mit einer Konzentration von 1 bis 100 g/l Hydrophobin und einem pH-Wert im Bereich von 5 bis 9 verwendet. Das Aufbringen der Hydrophobin-haltigen Lösung erfolgt in der Regel bei einer Temperatur im Bereich von 0 bis 140°C, bevorzugt im Bereich von 30 bis 80°C.

**[0074]** Die erfindungsgemäßen expandierbaren und expandierten, thermoplastischen Polymerpartikel sind antistatisch ausgerüstet, zeigen eine geringe Neigung zur Verklebung beim Verschäumen, jedoch eine gute Verschweißung beim Verschäumen zu Formteilen.

Beispiele:

Beispiel 1

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

**[0075]** 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: ggcgcgccatggctcaaacaggtactga

Hal571: gcagatctccagccgcttcttgatac  
 Hal572: ggccatgggattaacaatagggtactagg  
 Hal573: gcagatcttacaagtccttttgcttatattcc

5 Beispiel 2

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

10 **[0076]** 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-Terminalen FaktorXa 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.

15 **[0077]** Der so entstandene Vektor #508 kann zur Expressions eines Fusionsproteins bestehend aus, YAAD::Xa::dewA::His<sub>6</sub> verwendet werden.

KaM416: GCAGCCCATCAGGGATCCCTCAGCCTTGGTACCAGCGC

20 **KaM417: CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCAT-  
 GAAGTTCTCCGTCTCCGC**

25 Beispiel 3

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

**[0078]** Die Klonierung des Plasmids #513 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung der Oligonukleotide KaM 434 und KaM 435.

30 KaM434: GCTAAGCGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCATTGCTGC

KaM435: CCAATGGGGATCCGAGGATGGAGCCAAGGG

Beispiel 4

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

**[0079]** Die Klonierung des Plasmids #507 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung der Oligonukleotide KaM 417 und KaM 418.

Als Template DNA wurde ein künstlich synthetisierte DNA Sequenz - Hydrophobin BASF1 -eingesetzt (siehe Anhang).

40

**KaM417:CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCAT-  
 GAAGTTCTCCGTCTCCGC**

45

KaM418: CTGCCATTCAGGGGATCCCATATGGAGGAGGGAGACAG

Beispiel 5

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

**[0080]** Die Klonierung des Plasmids #506 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung der Oligonukleotide KaM 417 und KaM 418.

Als Template DNA wurde ein künstlich synthetisierte DNA Sequenz - Hydrophobin BASF2 -eingesetzt (siehe Anhang).

55



KaM417:CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCAT-  
GAAGTTCTCCGTCTCCGC

5

KaM418: CTGCCATTCAGGGGATCCCATATGGAGGAGGGAGACAG

Beispiel 6

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

**[0081]** Die Klonierung des Plasmids #526 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung der Oligonukleotide KaM464 und KaM465.

Als Template DNA wurde cDNA von Schyzophyllum commune eingesetzt (siehe Anhang).

15 KaM464: CGTTAAGGATCCGAGGATGTTGATGGGGGTGC

KaM465: GCTAACAGATCTATGTTCCGCCGTCTCCCCGTCGT

Beispiel 7

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

**[0082]** 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 1l Erlenmeyer Kolben mit Schikanen und 250ml LB Medium (+ 100µg/ml Ampicillin) werden mit jeweils 1ml der Vorkultur angeimpft und 9h bei

25 37°C auf einem Schüttler mit 180 UpM inkubiert.

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.

#### 30 Beispiel 8

Reinigung des rekombinanten Hydrophobin-Fusionsproteins

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

35

**[0083]** 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 Ultraturrax 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 Zentrifugen becher, 60 Minuten, 4°C, 12.000 Upm, 23.000 g). Gemäß SDS-PAGE Analyse ist das Hydrophobin nach der abschliessenden Zentrifugation im Überstand enthalten (Abbildung 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 äquilibriert 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.

50

**[0084]** Abbildung 1 zeigt die Reinigung des hergestellten Hydrophobins:

55

Spur 1:	Auftrag Nickel-Sepharose Säule (1:10 Verdünnung)
Spur 2:	Durchlauf = Eluat Waschschrift

(fortgesetzt)

Spuren 3 - 5: OD 280 Maxima der Elutionsfraktionen

5 **[0085]** Das Hydrophobin der Abbildung 1 besitzt ein Molekulargewicht von ca. 53 kD. Die kleineren Banden repräsentieren zum Teil Abbauprodukte des Hydrophobins.

Beispiel 9

10 Anwendungstechnische Prüfung; Charakterisierung des Hydrophobins durch Kontaktwinkeländerung eines Wassertropfens auf Glas

Substrat:

15 **[0086]** 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 % Polyoxyethylen(20) sorbitanmonolaureat (Tween® 20)
- 20 - danach Beschichtung waschen in destilliertem Wasser
- danach Inkubation 10min / 80°C / 1% Natrium-Dodecylsulfat (SDS) -Lösung in dest. Wasser
- Waschen in dest. Wasser

25 **[0087]** Die Proben werden an der Luft getrocknet und der Kontaktwinkel (in Grad) eines Tropfens von 5 µl Wasser bei Raumtemperatur bestimmt.

**[0088]** 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.

**[0089]** Unbehandeltes Glas ergab einen Kontaktwinkel von  $30 \pm 5^\circ$ ; eine Beschichtung mit dem funktionellen Hydrophobin gemäss Beispiel 8 (yaad-dewA-his<sub>6</sub>) ergab Kontaktwinkel von  $75 \pm 5^\circ$ .

30

Beispiel 10 und 11

Beschichtung von EPS-Perlen mit Hydrophobin pQE60+YaaD+Xa+dewA+HIS6

35 Beschichtungsmittel:

**[0090]** Wässrige Lösung von Hydrophobin pQE60+YaaD+Xa+dewA+HIS6 (SEQ ID NO: 19), welches gemäß Beispiel 8 vorbehandelt wurde. (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5, Konzentration Hydrophobin 6.08 g/l)

40 **[0091]** Durch Suspensionspolymerisation hergestellte, unbeschichtete, expandierbare Polystyrol (EPS)-Perlen mit einem Perlgrößenbereich von 0,7 bis 1,0 mm (Styropor® F 315/N) wurde getrocknet und wie folgt beschichtet:

**[0092]** 50 g EPS-Perlen wurden in einem 500 ml Schraubdeckelglas eingewogen, mit 10 ml bzw. 20 ml der Hydrophobin-Lösung versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur auf einem "Rollstuhl" bewegt. Anschließend wurde die mit Hydrophobin beschichteten EPS-Perlen auf einem Filterpapier ausgelegt und 5 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

45

Vergleichsversuch V1

**[0093]** Beispiel 10 wurde wiederholt mit dem Unterschied, dass anstelle der Hydrophobin-Lösung 10 ml destilliertes Wasser verwendet wurde.

50 **[0094]** Die beschichteten EPS-Perlen der Beispiele 10 und 11 und des Vergleichsversuches wurden jeweils für 2 Minuten bei 100°C im Rauscherkasten zu Polystyrol-Schaumperlen vorgeschäumt und nach 3 Tagen Lagerung zu Formteilen verschweißt. Zur Beurteilung der Güte der Verschweißung wurden die Formteile nach 2 Tagen Lagerung in der Mitte durchgebrochen.

55 **[0095]** Zur Beurteilung der antistatischen Eigenschaften wurde der Oberflächenwiderstand der vorgeschäumten und getrockneten Polystyrolschaumperlen gemessen.

# EP 1 893 675 B9

Tabelle 1

Beispiel	Hydrophobin- Lösung	Verklebung der vorgeschäumten EPS- Perlen	Verschweißung	Antistatik (Oberflächenwiderstand)
10	10 ml	wenig	Sehr gut	< 10 <sup>10</sup> Ohm.
11	20 ml	wenig	gut	
V1	0 ml	Stark	schlecht	> 10 <sup>14</sup> Ohm

**[0096]** 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 <sub>6</sub> DNA- und Polypeptid-sequenz	SEQ ID NO: 19
yaad-Xa-dewA-his Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 20
yaad-Xa-rodA-his DNA- und Polypeptid-sequenz	SEQ ID NO: 21
yaad-Xa-rodA-his Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 22
yaad-Xa-basf1-his DNA- und Polypeptid-sequenz	SEQ ID NO: 23
yaad-Xa-basf1-his Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 24

## SEQUENCE LISTING

**[0097]**

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Rekombinante Herstellung von Hydrophobinen

<130> AE 20040837

# EP 1 893 675 B9

<160> 24

<170> Patent In version 3.1

5 <210> 1  
<211> 405  
<212> DNA  
<213> basf-dewA

10 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(405)  
<223>

15 <400> 1

	atg cgc ttc atc gtc tct ctc ctc gcc ttc act gcc gcg gcc acc gcg	48
	Met Arg Phe Ile Val Ser Leu Leu Ala Phe Thr Ala Ala Ala Thr Ala	
	1 5 10 15	
20	acc gcc ctc ccg gcc tct gcc gca aag aac gcg aag ctg gcc acc tcg	96
	Thr Ala Leu Pro Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser	
	20 25 30	
25	gcg gcc ttc gcc aag cag gct gaa ggc acc acc tgc aat gtc ggc tcg	144
	Ala Ala Phe Ala Lys Gln Ala Glu Gly Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser	
	35 40 45	
	atc gct tgc tgc aac tcc ccc gct gag acc aac aac gac agt ctg ttg	192
	Ile Ala Cys Cys Asn Ser Pro Ala Glu Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu	
	50 55 60	
30	agc ggt ctg ctc ggt gct ggc ctt ctc aac ggg ctc tcg gcc aac act	240
	Ser Gly Leu Leu Gly Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr	
	65 70 75 80	
	ggc agc gcc tgc gcc aag gcg agc ttg att gac cag ctg ggt ctg ctc	288
	Gly Ser Ala Cys Ala Lys Ala Ser Leu Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu	
35	85 90 95	
	gct ctc gtc gac cac act gag gaa ggc ccc gtc tgc aag aac atc gtc	336
	Ala Leu Val Asp His Thr Glu Glu Gly Pro Val Cys Lys Asn Ile Val	
	100 105 110	
40	gct tgc tgc cct gag gga acc acc aac tgt gtt gcc gtc gac aac gct	384
	Ala Cys Cys Pro Glu Gly Thr Thr Asn Cys Val Ala Val Asp Asn Ala	
	115 120 125	
45	ggc gct ggt acc aag gct gag	405
	Gly Ala Gly Thr Lys Ala Glu	
	130 135	

50 <210> 2  
<211> 135  
<212> PRT  
<213> basf-dewA

<400> 2

55

# EP 1 893 675 B9

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

<210> 3  
 <211> 471  
 <212> DNA  
 <213> basf-rodA

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(471)  
 <223>

<400> 3

# EP 1 893 675 B9

	atg aag ttc tcc att gct gcc gct gtc gtt gct ttc gcc gcc tcc gtc Met Lys Phe Ser Ile Ala Ala Ala Val Val Ala Phe Ala Ala Ser Val 1 5 10 15	48
5	gcg gcc ctc cct cct gcc cat gat tcc cag ttc gct ggc aat ggt gtt Ala Ala Leu Pro Pro Ala His Asp Ser Gln Phe Ala Gly Asn Gly Val 20 25 30	96
10	ggc aac aag ggc aac agc aac gtc aag ttc cct gtc ccc gaa aac gtg Gly Asn Lys Gly Asn Ser Asn Val Lys Phe Pro Val Pro Glu Asn Val 35 40 45	144
	acc gtc aag cag gcc tcc gac aag tgc ggt gac cag gcc cag ctc tct Thr Val Lys Gln Ala Ser Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser 50 55 60	192
15	tgc tgc aac aag gcc acg tac gcc ggt gac acc aca acc gtt gat gag Cys Cys Asn Lys Ala Thr Tyr Ala Gly Asp Thr Thr Thr Val Asp Glu 65 70 75 80	240
20	ggt ctt ctg tct ggt gcc ctc agc ggc ctc atc ggc gcc ggg tct ggt Gly Leu Leu Ser Gly Ala Leu Ser Gly Leu Ile Gly Ala Gly Ser Gly 85 90 95	288
	gcc gaa ggt ctt ggt ctc ttc gat cag tgc tcc aag ctt gat gtt gct Ala Glu Gly Leu Gly Leu Phe Asp Gln Cys Ser Lys Leu Asp Val Ala 100 105 110	336
25	gtc ctc att ggc atc caa gat ctt gtc aac cag aag tgc aag caa aac Val Leu Ile Gly Ile Gln Asp Leu Val Asn Gln Lys Cys Lys Gln Asn 115 120 125	384
30	att gcc tgc tgc cag aac tcc ccc tcc agc gcg gat ggc aac ctt att Ile Ala Cys Cys Gln Asn Ser Pro Ser Ser Ala Asp Gly Asn Leu Ile 130 135 140	432
	ggt gtc ggt ctc cct tgc gtt gcc ctt ggc tcc atc ctc Gly Val Gly Leu Pro Cys Val Ala Leu Gly Ser Ile Leu 145 150 155	471
35	<210> 4 <211> 157 <212> PRT <213> basf-rodA	
40	<400> 4	
45	Met Lys Phe Ser Ile Ala Ala Ala Val Val Ala Phe Ala Ala Ser Val 1 5 10 15	
	Ala Ala Leu Pro Pro Ala His Asp Ser Gln Phe Ala Gly Asn Gly Val 20 25 30	
50	Gly Asn Lys Gly Asn Ser Asn Val Lys Phe Pro Val Pro Glu Asn Val 35 40 45	
55	Thr Val Lys Gln Ala Ser Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser 50 55 60	

# EP 1 893 675 B9

	Cys Cys Asn Lys Ala Thr Tyr Ala Gly Asp Thr Thr Thr Val Asp Glu	
	65 70 75 80	
5	Gly Leu Leu Ser Gly Ala Leu Ser Gly Leu Ile Gly Ala Gly Ser Gly	
	85 90 95	
10	Ala Glu Gly Leu Gly Leu Phe Asp Gln Cys Ser Lys Leu Asp Val Ala	
	100 105 110	
15	Val Leu Ile Gly Ile Gln Asp Leu Val Asn Gln Lys Cys Lys Gln Asn	
	115 120 125	
20	Ile Ala Cys Cys Gln Asn Ser Pro Ser Ser Ala Asp Gly Asn Leu Ile	
	130 135 140	
25	Gly Val Gly Leu Pro Cys Val Ala Leu Gly Ser Ile Leu	
	145 150 155	
30	<210> 5	
	<211> 336	
	<212> DNA	
	<213> basf-HypA	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(336)	
	<223>	
	<400> 5	
35	atg atc tct cgc gtc ctt gtc gct gct ctc gtc gct ctc ccc gct ctt	48
	Met Ile Ser Arg Val Leu Val Ala Ala Leu Val Ala Leu Pro Ala Leu	
	1 5 10 15	
40	gtt act gca act cct gct ccc gga aag cct aaa gcc agc agt cag tgc	96
	Val Thr Ala Thr Pro Ala Pro Gly Lys Pro Lys Ala Ser Ser Gln Cys	
	20 25 30	
45	gac gtc ggt gaa atc cat tgc tgt gac act cag cag act ccc gac cac	144
	Asp Val Gly Glu Ile His Cys Cys Asp Thr Gln Gln Thr Pro Asp His	
	35 40 45	
50	acc agc gcc gcc gcg tct ggt ttg ctt ggt gtt ccc atc aac ctt ggt	192
	Thr Ser Ala Ala Ala Ser Gly Leu Leu Gly Val Pro Ile Asn Leu Gly	
	50 55 60	
55	gct ttc ctc ggt ttc gac tgt acc ccc att tcc gtc ctt ggc gtc ggt	240
	Ala Phe Leu Gly Phe Asp Cys Thr Pro Ile Ser Val Leu Gly Val Gly	
	65 70 75 80	
	ggc aac aac tgt gct gct cag cct gtc tgc tgc aca gga aat caa ttc	288

# EP 1 893 675 B9

Gly Asn Asn Cys Ala Ala Gln Pro Val Cys Cys Thr Gly Asn Gln Phe  
 85 90 95  
 5 acc gca ttg att aac gct ctt gac tgc tct cct gtc aat gtc aac ctc 336  
 Thr Ala Leu Ile Asn Ala Leu Asp Cys Ser Pro Val Asn Val Asn Leu  
 100 105 110

<210> 6  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> basf-HypA

<400> 6  
 15

Met Ile Ser Arg Val Leu Val Ala Ala Leu Val Ala Leu Pro Ala Leu  
 1 5 10 15

Val Thr Ala Thr Pro Ala Pro Gly Lys Pro Lys Ala Ser Ser Gln Cys  
 20 25 30

Asp Val Gly Glu Ile His Cys Cys Asp Thr Gln Gln Thr Pro Asp His  
 35 40 45

Thr Ser Ala Ala Ala Ser Gly Leu Leu Gly Val Pro Ile Asn Leu Gly  
 50 55 60

Ala Phe Leu Gly Phe Asp Cys Thr Pro Ile Ser Val Leu Gly Val Gly  
 65 70 75 80

Gly Asn Asn Cys Ala Ala Gln Pro Val Cys Cys Thr Gly Asn Gln Phe  
 85 90 95

Thr Ala Leu Ile Asn Ala Leu Asp Cys Ser Pro Val Asn Val Asn Leu  
 100 105 110

<210> 7  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> basf-HypB

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(357)  
 <223>

<400> 7

55



# EP 1 893 675 B9

	atg gtc agc acg ttc atc act gtc gca aag acc ctt ctc gtc gcg ctc	48
	Met Val Ser Thr Phe Ile Thr Val Ala Lys Thr Leu Leu Val Ala Leu	
	1 5 10 15	
5	ctc ttc gtc aat atc aat atc gtc gtt ggt act gca act acc ggc aag	96
	Leu Phe Val Asn Ile Asn Ile Val Val Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys	
	20 25 30	
10	cat tgt agc acc ggt cct atc gag tgc tgc aag cag gtc atg gat tct	144
	His Cys Ser Thr Gly Pro Ile Glu Cys Cys Lys Gln Val Met Asp Ser	
	35 40 45	
15	aag agc cct cag gct acg gag ctt ctt acg aag aat ggc ctt ggc ctg	192
	Lys Ser Pro Gln Ala Thr Glu Leu Leu Thr Lys Asn Gly Leu Gly Leu	
	50 55 60	
20	ggt gtc ctt gct ggc gtg aag ggt ctt gtt ggc gcg aat tgc agc cct	240
	Gly Val Leu Ala Gly Val Lys Gly Leu Val Gly Ala Asn Cys Ser Pro	
	65 70 75 80	
25	atc acg gca att ggt att ggc tcc ggc agc caa tgc tct ggc cag acc	288
	Ile Thr Ala Ile Gly Ile Gly Ser Gly Ser Gln Cys Ser Gly Gln Thr	
	85 90 95	
30	gtt tgc tgc cag aat aat aat ttc aac ggt gtt gtc gct att ggt tgc	336
	Val Cys Cys Gln Asn Asn Asn Phe Asn Gly Val Val Ala Ile Gly Cys	
	100 105 110	
35	act ccc att aat gcc aat gtg	357
	Thr Pro Ile Asn Ala Asn Val	
	115	
40	<210> 8	
	<211> 119	
	<212> PRT	
	<213> basf-HypB	
45	<400> 8	
50	Met Val Ser Thr Phe Ile Thr Val Ala Lys Thr Leu Leu Val Ala Leu	
	1 5 10 15	
55	Leu Phe Val Asn Ile Asn Ile Val Val Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys	
	20 25 30	
60	His Cys Ser Thr Gly Pro Ile Glu Cys Cys Lys Gln Val Met Asp Ser	
	35 40 45	
65	Lys Ser Pro Gln Ala Thr Glu Leu Leu Thr Lys Asn Gly Leu Gly Leu	
	50 55 60	
70	Gly Val Leu Ala Gly Val Lys Gly Leu Val Gly Ala Asn Cys Ser Pro	
	65 70 75 80	
75	Ile Thr Ala Ile Gly Ile Gly Ser Gly Ser Gln Cys Ser Gly Gln Thr	
	85 90 95	

# EP 1 893 675 B9

Val Cys Cys Gln Asn Asn Asn Phe Asn Gly Val Val Ala Ile Gly Cys  
100 105 110

5 Thr Pro Ile Asn Ala Asn Val  
115

<210> 9  
<211> 408  
<212> DNA  
<213> basf-sc3

15 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(408)  
<223>

20 <400> 9

atg ttc gcc cgt ctc ccc gtc gtg ttc ctc tac gcc ttc gtc gcg ttc 48  
Met Phe Ala Arg Leu Pro Val Val Phe Leu Tyr Ala Phe Val Ala Phe  
1 5 10 15

25 ggc gcc ctc gtc gct gcc ctc cca ggt ggc cac ccg ggc acg acc acg 96  
Gly Ala Leu Val Ala Ala Leu Pro Gly Gly His Pro Gly Thr Thr Thr  
20 25 30

30 ccg ccg gtt acg acg acg gtg acg gtg acc acg ccg ccc tcg acg acg 144  
Pro Pro Val Thr Thr Thr Val Thr Val Thr Thr Pro Pro Ser Thr Thr  
35 40 45

acc atc gcc gcc ggt ggc acg tgt act acg ggg tcg ctc tct tgc tgc 192  
Thr Ile Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Thr Gly Ser Leu Ser Cys Cys  
50 55 60

35 aac cag gtt caa tcg gcg agc agc agc cct gtt acc gcc ctc ctc ggc 240  
Asn Gln Val Gln Ser Ala Ser Ser Ser Pro Val Thr Ala Leu Leu Gly  
65 70 75 80

40 ctg ctc ggc att gtc ctc agc gac ctc aac gtt ctc gtt ggc atc agc 288  
Leu Leu Gly Ile Val Leu Ser Asp Leu Asn Val Leu Val Gly Ile Ser  
85 90 95

tgc tct ccc ctc act gtc atc ggt gtc gga ggc agc ggc tgt tcg gcg 336  
Cys Ser Pro Leu Thr Val Ile Gly Val Gly Gly Ser Gly Cys Ser Ala  
100 105 110

45 cag acc gtc tgc tgc gaa aac acc caa ttc aac ggg ctg atc aac atc 384  
Gln Thr Val Cys Cys Glu Asn Thr Gln Phe Asn Gly Leu Ile Asn Ile  
115 120 125

50 ggt tgc acc ccc atc aac atc ctc 408  
Gly Cys Thr Pro Ile Asn Ile Leu  
130 135

<210> 10  
<211> 136  
<212> PRT  
<213> basf-sc3

<400> 10

# EP 1 893 675 B9

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

35 <210> 11  
 <211> 483  
 <212> DNA  
 <213> basf-BASF1

40 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(483)  
 <223>

<400> 11

45

50

55

# EP 1 893 675 B9

	atg aag ttc tcc gtc tcc gcc gcc gtc ctc gcc ttc gcc gcc tcc gtc	48
	Met Lys Phe Ser Val Ser Ala Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ser Val	
	1 5 10 15	
5	gcc gcc ctc cct cag cac gac tcc gcc gcc ggc aac ggc aac ggc gtc	96
	Ala Ala Leu Pro Gln His Asp Ser Ala Ala Gly Asn Gly Asn Gly Val	
	20 25 30	
	ggc aac aag ttc cct gtc cct gac gac gtc acc gtc aag cag gcc acc	144
	Gly Asn Lys Phe Pro Val Pro Asp Asp Val Thr Val Lys Gln Ala Thr	
10	35 40 45	
	gac aag tgc ggc gac cag gcc cag ctc tcc tgc tgc aac aag gcc acc	192
	Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys Asn Lys Ala Thr	
	50 55 60	
15	tac gcc ggc gac gtc ctc acc gac atc gac gag ggc atc ctc gcc ggc	240
	Tyr Ala Gly Asp Val Leu Thr Asp Ile Asp Glu Gly Ile Leu Ala Gly	
	65 70 75 80	
	ctc ctc aag aac ctc atc ggc ggc ggc tcc ggc tcc gag ggc ctc ggc	288
	Leu Leu Lys Asn Leu Ile Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Gly Leu Gly	
20	85 90 95	
	ctc ttc gac cag tgc gtc aag ctc gac ctc cag atc tcc gtc atc ggc	336
	Leu Phe Asp Gln Cys Val Lys Leu Asp Leu Gln Ile Ser Val Ile Gly	
	100 105 110	
25	atc cct atc cag gac ctc ctc aac cag gtc aac aag cag tgc aag cag	384
	Ile Pro Ile Gln Asp Leu Leu Asn Gln Val Asn Lys Gln Cys Lys Gln	
	115 120 125	
	aac atc gcc tgc tgc cag aac tcc cct tcc gac gcc acc ggc tcc ctc	432
	Asn Ile Ala Cys Cys Gln Asn Ser Pro Ser Asp Ala Thr Gly Ser Leu	
30	130 135 140	
	gtc aac ctc ggc ctc ggc aac cct tgc atc cct gtc tcc ctc ctc cat	480
	Val Asn Leu Gly Leu Gly Asn Pro Cys Ile Pro Val Ser Leu Leu His	
	145 150 155 160	
35	atg	483
	Met	

<210> 12

<211> 161

40 <212> PRT

<213> basf-BASF1

<400> 12

45

Met Lys Phe Ser Val Ser Ala Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ser Val  
1 5 10 15

50

Ala Ala Leu Pro Gln His Asp Ser Ala Ala Gly Asn Gly Asn Gly Val  
20 25 30

Gly Asn Lys Phe Pro Val Pro Asp Asp Val Thr Val Lys Gln Ala Thr  
35 40 45

55

# EP 1 893 675 B9

5 Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys Asn Lys Ala Thr  
 50 55 60  
 Tyr Ala Gly Asp Val Leu Thr Asp Ile Asp Glu Gly Ile Leu Ala Gly  
 65 70 75 80  
 10 Leu Leu Lys Asn Leu Ile Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Gly Leu Gly  
 85 90 95  
 Leu Phe Asp Gln Cys Val Lys Leu Asp Leu Gln Ile Ser Val Ile Gly  
 100 105 110  
 15 Ile Pro Ile Gln Asp Leu Leu Asn Gln Val Asn Lys Gln Cys Lys Gln  
 115 120 125  
 20 Asn Ile Ala Cys Cys Gln Asn Ser Pro Ser Asp Ala Thr Gly Ser Leu  
 130 135 140  
 Val Asn Leu Gly Leu Gly Asn Pro Cys Ile Pro Val Ser Leu Leu His  
 145 150 155 160  
 25 Met  
 <210> 13  
 <211> 465  
 30 <212> DNA  
 <213> basf-BASF2  
 <220>  
 <221> CDS  
 35 <222> (1)..(465)  
 <223>  
 <400> 13  
 40 atg aag ttc tcc gtc tcc gcc gcc gtc ctc gcc ttc gcc gcc tcc gtc 48  
 Met Lys Phe Ser Val Ser Ala Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ser Val  
 1 5 10 15  
 gcc gcc ctc cct cag cac gac tcc gcc gcc ggc aac ggc aac ggc gtc 96  
 45 Ala Ala Leu Pro Gln His Asp Ser Ala Ala Gly Asn Gly Asn Gly Val  
 20 25 30  
 ggc aac aag ttc cct gtc cct gac gac gtc acc gtc aag cag gcc acc 144  
 Gly Asn Lys Phe Pro Val Pro Asp Asp Val Thr Val Lys Gln Ala Thr  
 35 40 45  
 50 gac aag tgc ggc gac cag gcc cag ctc tcc tgc tgc aac aag gcc acc 192  
 55

# EP 1 893 675 B9

	Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys Asn Lys Ala Thr	
	50 55 60	
5	tac gcc ggc gac gtc acc gac atc gac gag ggc atc ctc gcc ggc ctc Tyr Ala Gly Asp Val Thr Asp Ile Asp Glu Gly Ile Leu Ala Gly Leu	240
	65 70 75 80	
	ctc aag aac ctc atc ggc ggc ggc tcc ggc tcc gag ggc ctc ggc ctc Leu Lys Asn Leu Ile Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Gly Leu Gly Leu	288
10	85 90 95	
	ttc gac cag tgc gtc aag ctc gac ctc cag atc tcc gtc atc ggc atc Phe Asp Gln Cys Val Lys Leu Asp Leu Gln Ile Ser Val Ile Gly Ile	336
	100 105 110	
15	cct atc cag gac ctc ctc aac cag cag tgc aag cag aac atc gcc tgc Pro Ile Gln Asp Leu Leu Asn Gln Gln Cys Lys Gln Asn Ile Ala Cys	384
	115 120 125	
	tgc cag aac tcc cct tcc gac gcc acc ggc tcc ctc gtc aac ctc ggc Cys Gln Asn Ser Pro Ser Asp Ala Thr Gly Ser Leu Val Asn Leu Gly	432
20	130 135 140	
	aac cct tgc atc cct gtc tcc ctc ctc cat atg Asn Pro Cys Ile Pro Val Ser Leu Leu His Met	465
	145 150 155	
25		
	<210> 14	
	<211> 155	
	<212> PRT	
	<213> basf-BASF2	
30		
	<400> 14	
35	Met Lys Phe Ser Val Ser Ala Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ser Val	
	1 5 10 15	
	Ala Ala Leu Pro Gln His Asp Ser Ala Ala Gly Asn Gly Asn Gly Val	
	20 25 30	
40		
	Gly Asn Lys Phe Pro Val Pro Asp Asp Val Thr Val Lys Gln Ala Thr	
	35 40 45	
45	Asp Lys Cys Gly Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys Asn Lys Ala Thr	
	50 55 60	
	Tyr Ala Gly Asp Val Thr Asp Ile Asp Glu Gly Ile Leu Ala Gly Leu	
	65 70 75 80	
50		
	Leu Lys Asn Leu Ile Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Gly Leu Gly Leu	
	85 90 95	
55	Phe Asp Gln Cys Val Lys Leu Asp Leu Gln Ile Ser Val Ile Gly Ile	
	100 105 110	

# EP 1 893 675 B9

	Pro	Ile	Gln	Asp	Leu	Leu	Asn	Gln	Gln	Cys	Lys	Gln	Asn	Ile	Ala	Cys	
			115					120					125				
5	Cys	Gln	Asn	Ser	Pro	Ser	Asp	Ala	Thr	Gly	Ser	Leu	Val	Asn	Leu	Gly	
		130					135					140					
10	Asn	Pro	Cys	Ile	Pro	Val	Ser	Leu	Leu	His	Met						
	145					150					155						
	<210> 15																
	<211> 882																
	<212> DNA																
15	<213> basf-yaad																
	<220>																
	<221> CDS																
	<222> (1)..(882)																
20	<223>																
	<400> 15																
25	atg	gct	caa	aca	ggt	act	gaa	cgt	gta	aaa	cgc	gga	atg	gca	gaa	atg	48
	Met	Ala	Gln	Thr	Gly	Thr	Glu	Arg	Val	Lys	Arg	Gly	Met	Ala	Glu	Met	
	1				5					10				15			
30	caa	aaa	ggc	ggc	gtc	atc	atg	gac	gtc	atc	aat	gcg	gaa	caa	gcg	aaa	96
	Gln	Lys	Gly	Gly	Val	Ile	Met	Asp	Val	Ile	Asn	Ala	Glu	Gln	Ala	Lys	
			20					25					30				
	atc	gct	gaa	gaa	gct	gga	gct	gtc	gct	gta	atg	gcg	cta	gaa	cgt	gtg	144
	Ile	Ala	Glu	Glu	Ala	Gly	Ala	Val	Ala	Val	Met	Ala	Leu	Glu	Arg	Val	
			35				40						45				
35	cca	gca	gat	att	cgc	gcg	gct	gga	gga	gtt	gcc	cgt	atg	gct	gac	cct	192
	Pro	Ala	Asp	Ile	Arg	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Arg	Met	Ala	Asp	Pro	
		50					55					60					
40	aca	atc	gtg	gaa	gaa	gta	atg	aat	gca	gta	tct	atc	ccg	gta	atg	gca	240
	Thr	Ile	Val	Glu	Glu	Val	Met	Asn	Ala	Val	Ser	Ile	Pro	Val	Met	Ala	
	65				70					75					80		
	aaa	gcg	cgt	atc	gga	cat	att	gtt	gaa	gcg	cgt	gtg	ctt	gaa	gct	atg	288
	Lys	Ala	Arg	Ile	Gly	His	Ile	Val	Glu	Ala	Arg	Val	Leu	Glu	Ala	Met	
				85					90					95			
45	ggt	gtt	gac	tat	att	gat	gaa	agt	gaa	gtt	ctg	acg	ccg	gct	gac	gaa	336
	Gly	Val	Asp	Tyr	Ile	Asp	Glu	Ser	Glu	Val	Leu	Thr	Pro	Ala	Asp	Glu	
			100					105					110				
50	gaa	ttt	cat	tta	aat	aaa	aat	gaa	tac	aca	gtt	cct	ttt	gtc	tgt	ggc	384
	Glu	Phe	His	Leu	Asn	Lys	Asn	Glu	Tyr	Thr	Val	Pro	Phe	Val	Cys	Gly	
			115					120					125				
	tgc	cgt	gat	ctt	ggt	gaa	gca	aca	cgc	cgt	att	gcg	gaa	ggt	gct	tct	432
	Cys	Arg	Asp	Leu	Gly	Glu	Ala	Thr	Arg	Arg	Ile	Ala	Glu	Gly	Ala	Ser	
		130					135					140					
55																	

# EP 1 893 675 B9

	atg ctt cgc aca aaa ggt gag cct gga aca ggt aat att gtt gag gct	480
	Met Leu Arg Thr Lys Gly Glu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Val Glu Ala	
	145 150 155 160	
5	gtt cgc cat atg cgt aaa gtt aac gct caa gtg cgc aaa gta gtt gcg	528
	Val Arg His Met Arg Lys Val Asn Ala Gln Val Arg Lys Val Val Ala	
	165 170 175	
10	atg agt gag gat gag cta atg aca gaa gcg aaa aac cta ggt gct cct	576
	Met Ser Glu Asp Glu Leu Met Thr Glu Ala Lys Asn Leu Gly Ala Pro	
	180 185 190	
	tac gag ctt ctt ctt caa att aaa aaa gac ggc aag ctt cct gtc gtt	624
	Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Ile Lys Lys Asp Gly Lys Leu Pro Val Val	
	195 200 205	
15	aac ttt gcc gct ggc ggc gta gca act cca gct gat gct gct ctc atg	672
	Asn Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Ala Asp Ala Ala Leu Met	
	210 215 220	
20	atg cag ctt ggt gct gac gga gta ttt gtt ggt tct ggt att ttt aaa	720
	Met Gln Leu Gly Ala Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe Lys	
	225 230 235 240	
	tca gac aac cct gct aaa ttt gcg aaa gca att gtg gaa gca aca act	768
	Ser Asp Asn Pro Ala Lys Phe Ala Lys Ala Ile Val Glu Ala Thr Thr	
	245 250 255	
25	cac ttt act gat tac aaa tta atc gct gag ttg tca aaa gag ctt ggt	816
	His Phe Thr Asp Tyr Lys Leu Ile Ala Glu Leu Ser Lys Glu Leu Gly	
	260 265 270	
	act gca atg aaa ggg att gaa atc tca aac tta ctt cca gaa cag cgt	864
30	Thr Ala Met Lys Gly Ile Glu Ile Ser Asn Leu Leu Pro Glu Gln Arg	
	275 280 285	
	atg caa gaa cgc ggc tgg	882
	Met Gln Glu Arg Gly Trp	
	290	
35	<210> 16	
	<211> 294	
	<212> PRT	
	<213> basf-yaad	
40	<400> 16	
45	Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met	
	1 5 10 15	
	Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys	
	20 25 30	
50	Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ala Val Met Ala Leu Glu Arg Val	
	35 40 45	
55	Pro Ala Asp Ile Arg Ala Ala Gly Gly Val Ala Arg Met Ala Asp Pro	
	50 55 60	



# EP 1 893 675 B9

5	Thr	Ile	Val	Glu	Glu	Val	Met	Asn	Ala	Val	Ser	Ile	Pro	Val	Met	Ala	65	70	75	80
	Lys	Ala	Arg	Ile	Gly	His	Ile	Val	Glu	Ala	Arg	Val	Leu	Glu	Ala	Met	85	90	95	
10	Gly	Val	Asp	Tyr	Ile	Asp	Glu	Ser	Glu	Val	Leu	Thr	Pro	Ala	Asp	Glu	100	105	110	
	Glu	Phe	His	Leu	Asn	Lys	Asn	Glu	Tyr	Thr	Val	Pro	Phe	Val	Cys	Gly	115	120	125	
15	Cys	Arg	Asp	Leu	Gly	Glu	Ala	Thr	Arg	Arg	Ile	Ala	Glu	Gly	Ala	Ser	130	135	140	
20	Met	Leu	Arg	Thr	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Thr	Gly	Asn	Ile	Val	Glu	Ala	145	150	155	160
	Val	Arg	His	Met	Arg	Lys	Val	Asn	Ala	Gln	Val	Arg	Lys	Val	Val	Ala	165	170	175	
25	Met	Ser	Glu	Asp	Glu	Leu	Met	Thr	Glu	Ala	Lys	Asn	Leu	Gly	Ala	Pro	180	185	190	
30	Tyr	Glu	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Lys	Lys	Asp	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Val	195	200	205	
	Asn	Phe	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Thr	Pro	Ala	Asp	Ala	Ala	Leu	Met	210	215	220	
35	Met	Gln	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Phe	Val	Gly	Ser	Gly	Ile	Phe	Lys	225	230	235	240
40	Ser	Asp	Asn	Pro	Ala	Lys	Phe	Ala	Lys	Ala	Ile	Val	Glu	Ala	Thr	Thr	245	250	255	
	His	Phe	Thr	Asp	Tyr	Lys	Leu	Ile	Ala	Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Leu	Gly	260	265	270	
45	Thr	Ala	Met	Lys	Gly	Ile	Glu	Ile	Ser	Asn	Leu	Leu	Pro	Glu	Gln	Arg	275	280	285	
50	Met	Gln	Glu	Arg	Gly	Trp											290			

<210> 17  
 <211> 591  
 <212> DNA  
 <213> basf-yaae

<220>  
 <221> CDS

# EP 1 893 675 B9

<222> (1)..(591)

<223>

<400> 17

5

atg gga tta aca ata ggt gta cta gga ctt caa gga gca gtt aga gag	48
Met Gly Leu Thr Ile Gly Val Leu Gly Leu Gln Gly Ala Val Arg Glu	
1 5 10 15	

10

cac atc cat gcg att gaa gca tgc ggc gcg gct ggt ctt gtc gta aaa	96
His Ile His Ala Ile Glu Ala Cys Gly Ala Ala Gly Leu Val Val Lys	
20 25 30	

15

cgt ccg gag cag ctg aac gaa gtt gac ggg ttg att ttg ccg ggc ggt	144
Arg Pro Glu Gln Leu Asn Glu Val Asp Gly Leu Ile Leu Pro Gly Gly	
35 40 45	

20

gag agc acg acg atg cgc cgt ttg atc gat acg tat caa ttc atg gag	192
Glu Ser Thr Thr Met Arg Arg Leu Ile Asp Thr Tyr Gln Phe Met Glu	
50 55 60	

25

ccg ctt cgt gaa ttc gct gct cag ggc aaa ccg atg ttt gga aca tgt	240
Pro Leu Arg Glu Phe Ala Gln Gly Lys Pro Met Phe Gly Thr Cys	
65 70 75 80	

gcc gga tta att ata tta gca aaa gaa att gcc ggt tca gat aat cct	288
Ala Gly Leu Ile Ile Leu Ala Lys Glu Ile Ala Gly Ser Asp Asn Pro	
85 90 95	

30

cat tta ggt ctt ctg aat gtg gtt gta gaa cgt aat tca ttt ggc cgg	336
His Leu Gly Leu Leu Asn Val Val Val Glu Arg Asn Ser Phe Gly Arg	
100 105 110	

cag gtt gac agc ttt gaa gct gat tta aca att aaa ggc ttg gac gag	384
Gln Val Asp Ser Phe Glu Ala Asp Leu Thr Ile Lys Gly Leu Asp Glu	
115 120 125	

35

cct ttt act ggg gta ttc atc cgt gct ccg cat att tta gaa gct ggt	432
Pro Phe Thr Gly Val Phe Ile Arg Ala Pro His Ile Leu Glu Ala Gly	
130 135 140	

gaa aat gtt gaa gtt cta tcg gag cat aat ggt cgt att gta gcc gcg	480
Glu Asn Val Glu Val Leu Ser Glu His Asn Gly Arg Ile Val Ala Ala	
145 150 155 160	

40

aaa cag ggg caa ttc ctt ggc tgc tca ttc cat ccg gag ctg aca gaa	528
Lys Gln Gly Gln Phe Leu Gly Cys Ser Phe His Pro Glu Leu Thr Glu	
165 170 175	

45

gat cac cga gtg acg cag ctg ttt gtt gaa atg gtt gag gaa tat aag	576
Asp His Arg Val Thr Gln Leu Phe Val Glu Met Val Glu Glu Tyr Lys	
180 185 190	

caa aag gca ctt gta	591
Gln Lys Ala Leu Val	
195	

50

<210> 18

<211> 197

<212> PRT

<213> basf-yaee

55

<400> 18

# EP 1 893 675 B9

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

45 <210> 19  
 <211> 1329  
 <212> DNA  
 <213> basf-yaad-Xa-dewa-his

50 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1329)  
 <223>

55 <400> 19

# EP 1 893 675 B9

	atg gct caa aca ggt act gaa cgt gta aaa cgc gga atg gca gaa atg	48
	Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met	
	1 5 10 15	
5	caa aaa ggc ggc gtc atc atg gac gtc atc aat gcg gaa caa gcg aaa	96
	Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys	
	20 25 30	
	atc gct gaa gaa gct gga gct gtc gct gta atg gcg cta gaa cgt gtg	144
10	Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ala Val Met Ala Leu Glu Arg Val	
	35 40 45	
	cca gca gat att cgc gcg gct gga gga gtt gcc cgt atg gct gac cct	192
	Pro Ala Asp Ile Arg Ala Ala Gly Gly Val Ala Arg Met Ala Asp Pro	
	50 55 60	
15	aca atc gtg gaa gaa gta atg aat gca gta tct atc ccg gta atg gca	240
	Thr Ile Val Glu Glu Val Met Asn Ala Val Ser Ile Pro Val Met Ala	
	65 70 75 80	
	aaa gcg cgt atc gga cat att gtt gaa gcg cgt gtg ctt gaa gct atg	288
20	Lys Ala Arg Ile Gly His Ile Val Glu Ala Arg Val Leu Glu Ala Met	
	85 90 95	
	ggt gtt gac tat att gat gaa agt gaa gtt ctg acg ccg gct gac gaa	336
	Gly Val Asp Tyr Ile Asp Glu Ser Glu Val Leu Thr Pro Ala Asp Glu	
	100 105 110	
25	gaa ttt cat tta aat aaa aat gaa tac aca gtt cct ttt gtc tgt ggc	384
	Glu Phe His Leu Asn Lys Asn Glu Tyr Thr Val Pro Phe Val Cys Gly	
	115 120 125	
	tgc cgt gat ctt ggt gaa gca aca cgc cgt att gcg gaa ggt gct tct	432
30	Cys Arg Asp Leu Gly Glu Ala Thr Arg Arg Ile Ala Glu Gly Ala Ser	
	130 135 140	
	atg ctt cgc aca aaa ggt gag cct gga aca ggt aat att gtt gag gct	480
	Met Leu Arg Thr Lys Gly Glu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Val Glu Ala	
	145 150 155 160	
35	gtt cgc cat atg cgt aaa gtt aac gct caa gtg cgc aaa gta gtt gcg	528
	Val Arg His Met Arg Lys Val Asn Ala Gln Val Arg Lys Val Val Ala	
	165 170 175	
	atg agt gag gat gag cta atg aca gaa gcg aaa aac cta ggt gct cct	576
40	Met Ser Glu Asp Glu Leu Met Thr Glu Ala Lys Asn Leu Gly Ala Pro	
	180 185 190	
	tac gag ctt ctt ctt caa att aaa aaa gac ggc aag ctt cct gtc gtt	624
	Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Ile Lys Lys Asp Gly Lys Leu Pro Val Val	
	195 200 205	
45		
50		
55		

EP 1 893 675 B9

	aac ttt gcc gct ggc ggc gta gca act cca gct gat gct gct ctc atg	672
	Asn Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Ala Asp Ala Ala Leu Met	
	210 215 220	
5	atg cag ctt ggt gct gac gga gta ttt gtt ggt tct ggt att ttt aaa	720
	Met Gln Leu Gly Ala Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe Lys	
	225 230 235 240	
10	tca gac aac cct gct aaa ttt gcg aaa gca att gtg gaa gca aca act	768
	Ser Asp Asn Pro Ala Lys Phe Ala Lys Ala Ile Val Glu Ala Thr Thr	
	245 250 255	
15	cac ttt act gat tac aaa tta atc gct gag ttg tca aaa gag ctt ggt	816
	His Phe Thr Asp Tyr Lys Leu Ile Ala Glu Leu Ser Lys Glu Leu Gly	
	260 265 270	
20	act gca atg aaa ggg att gaa atc tca aac tta ctt cca gaa cag cgt	864
	Thr Ala Met Lys Gly Ile Glu Ile Ser Asn Leu Leu Pro Glu Gln Arg	
	275 280 285	
25	atg caa gaa cgc ggc tgg aga tcc att gaa ggc cgc atg cgc ttc atc	912
	Met Gln Glu Arg Gly Trp Arg Ser Ile Glu Gly Arg Met Arg Phe Ile	
	290 295 300	
30	gtc tct ctc ctc gcc ttc act gcc gcg gcc acc gcg acc gcc ctc ccg	960
	Val Ser Leu Leu Ala Phe Thr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Leu Pro	
	305 310 315 320	
35	gcc tct gcc gca aag aac gcg aag ctg gcc acc tcg gcg gcc ttc gcc	1008
	Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser Ala Ala Phe Ala	
	325 330 335	
40	aag cag gct gaa ggc acc acc tgc aat gtc ggc tcg atc gct tgc tgc	1056
	Lys Gln Ala Glu Gly Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser Ile Ala Cys Cys	
	340 345 350	
45	aac tcc ccc gct gag acc aac aac gac agt ctg ttg agc ggt ctg ctc	1104
	Asn Ser Pro Ala Glu Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu	
	355 360 365	
50	ggt gct ggc ctt ctc aac ggg ctc tcg ggc aac act ggc agc gcc tgc	1152
	Gly Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr Gly Ser Ala Cys	
	370 375 380	
55	gcc aag gcg agc ttg att gac cag ctg ggt ctg ctc gct ctc gtc gac	1200
	Ala Lys Ala Ser Leu Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu Ala Leu Val Asp	
	385 390 395 400	
60	cac act gag gaa ggc ccc gtc tgc aag aac atc gtc gct tgc tgc cct	1248
	His Thr Glu Glu Gly Pro Val Cys Lys Asn Ile Val Ala Cys Cys Pro	
	405 410 415	
65	gag gga acc acc aac tgt gtt gcc gtc gac aac gct ggc gct ggt acc	1296
	Glu Gly Thr Thr Asn Cys Val Ala Val Asp Asn Ala Gly Ala Gly Thr	
	420 425 430	
70	aag gct gag gga tct cat cac cat cac cat cac	1329
	Lys Ala Glu Gly Ser His His His His His His	
	435 440	

<210> 20

<211> 443

<212> PRT

<213> basf-yaad-Xa-dewa-his

<400> 20

# EP 1 893 675 B9

Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met  
1 5 10 15

5 Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys  
20 25 30

10 Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ala Val Met Ala Leu Glu Arg Val  
35 40 45

Pro Ala Asp Ile Arg Ala Ala Gly Gly Val Ala Arg Met Ala Asp Pro  
50 55 60

15 Thr Ile Val Glu Glu Val Met Asn Ala Val Ser Ile Pro Val Met Ala  
65 70 75 80

20 Lys Ala Arg Ile Gly His Ile Val Glu Ala Arg Val Leu Glu Ala Met  
85 90 95

Gly Val Asp Tyr Ile Asp Glu Ser Glu Val Leu Thr Pro Ala Asp Glu  
100 105 110

25 Glu Phe His Leu Asn Lys Asn Glu Tyr Thr Val Pro Phe Val Cys Gly  
115 120 125

30 Cys Arg Asp Leu Gly Glu Ala Thr Arg Arg Ile Ala Glu Gly Ala Ser  
130 135 140

Met Leu Arg Thr Lys Gly Glu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Val Glu Ala  
145 150 155 160

35 Val Arg His Met Arg Lys Val Asn Ala Gln Val Arg Lys Val Val Ala  
165 170 175

Met Ser Glu Asp Glu Leu Met Thr Glu Ala Lys Asn Leu Gly Ala Pro  
180 185 190

40 Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Ile Lys Lys Asp Gly Lys Leu Pro Val Val  
195 200 205

45 Asn Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Ala Asp Ala Ala Leu Met  
210 215 220

Met Gln Leu Gly Ala Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe Lys  
225 230 235 240

50 Ser Asp Asn Pro Ala Lys Phe Ala Lys Ala Ile Val Glu Ala Thr Thr  
245 250 255

55

# EP 1 893 675 B9

5	His Phe Thr Asp Tyr Lys Leu Ile Ala Glu Leu Ser Lys Glu Leu Gly	260	265	270
	Thr Ala Met Lys Gly Ile Glu Ile Ser Asn Leu Leu Pro Glu Gln Arg	275	280	285
10	Met Gln Glu Arg Gly Trp Arg Ser Ile Glu Gly Arg Met Arg Phe Ile	290	295	300
	Val Ser Leu Leu Ala Phe Thr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Leu Pro	305	310	315
15	Ala Ser Ala Ala Lys Asn Ala Lys Leu Ala Thr Ser Ala Ala Phe Ala	325	330	335
20	Lys Gln Ala Glu Gly Thr Thr Cys Asn Val Gly Ser Ile Ala Cys Cys	340	345	350
	Asn Ser Pro Ala Glu Thr Asn Asn Asp Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu	355	360	365
25	Gly Ala Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asn Thr Gly Ser Ala Cys	370	375	380
30	Ala Lys Ala Ser Leu Ile Asp Gln Leu Gly Leu Leu Ala Leu Val Asp	385	390	395
	His Thr Glu Glu Gly Pro Val Cys Lys Asn Ile Val Ala Cys Cys Pro	405	410	415
35	Glu Gly Thr Thr Asn Cys Val Ala Val Asp Asn Ala Gly Ala Gly Thr	420	425	430
40	Lys Ala Glu Gly Ser His His His His His His	435	440	

<210> 21

<211> 1395

<212> DNA

<213> basf-yaad-Xa-rodA-his

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1395)

<223>

<400> 21

EP 1 893 675 B9

	atg gct caa aca ggt act gaa cgt gta aaa cgc gga atg gca gaa atg	48
	Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met	
	1 5 10 15	
5	caa aaa ggc ggc gtc atc atg gac gtc atc aat gcg gaa caa gcg aaa	96
	Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys	
	20 25 30	
10	atc gct gaa gaa gct gga gct gtc gct gta atg gcg cta gaa cgt gtg	144
	Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ala Val Met Ala Leu Glu Arg Val	
	35 40 45	
15	cca gca gat att cgc gcg gct gga gga gtt gcc cgt atg gct gac cct	192
	Pro Ala Asp Ile Arg Ala Gly Gly Val Ala Arg Met Ala Asp Pro	
	50 55 60	
20	aca atc gtg gaa gaa gta atg aat gca gta tct atc ccg gta atg gca	240
	Thr Ile Val Glu Glu Val Met Asn Ala Val Ser Ile Pro Val Met Ala	
	65 70 75 80	
25	aaa gcg cgt atc gga cat att gtt gaa gcg cgt gtg ctt gaa gct atg	288
	Lys Ala Arg Ile His Ile Val Glu Ala Arg Val Leu Glu Ala Met	
	85 90 95	
30	ggt gtt gac tat att gat gaa agt gaa gtt ctg acg ccg gct gac gaa	336
	Gly Val Asp Tyr Ile Asp Glu Ser Glu Val Leu Thr Pro Ala Asp Glu	
	100 105 110	
35	gaa ttt cat tta aat aaa aat gaa tac aca gtt cct ttt gtc tgt ggc	384
	Glu Phe His Leu Asn Lys Asn Glu Tyr Thr Val Pro Phe Val Cys Gly	
	115 120 125	
40	tgc cgt gat ctt ggt gaa gca aca cgc cgt att gcg gaa ggt gct tct	432
	Cys Arg Asp Leu Gly Glu Ala Thr Arg Arg Ile Ala Glu Gly Ala Ser	
	130 135 140	
45	atg ctt cgc aca aaa ggt gag cct gga aca ggt aat att gtt gag gct	480
	Met Leu Arg Thr Lys Gly Glu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Val Glu Ala	
	145 150 155 160	
50	gtt cgc cat atg cgt aaa gtt aac gct caa gtg cgc aaa gta gtt gcg	528
	Val Arg His Met Arg Lys Val Asn Ala Gln Val Arg Lys Val Val Ala	
	165 170 175	
55	atg agt gag gat gag cta atg aca gaa gcg aaa aac cta ggt gct cct	576
	Met Ser Glu Asp Glu Leu Met Thr Glu Ala Lys Asn Leu Gly Ala Pro	
	180 185 190	
60	tac gag ctt ctt ctt caa att aaa aaa gac ggc aag ctt cct gtc gtt	624
	Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Ile Lys Lys Asp Gly Lys Leu Pro Val Val	
	195 200 205	
65	aac ttt gcc gct ggc ggc gta gca act cca gct gat gct gct ctc atg	672
	Asn Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Ala Asp Ala Ala Leu Met	
	210 215 220	
70	atg cag ctt ggt gct gac gga gta ttt gtt ggt tct ggt att ttt aaa	720
	Met Gln Leu Gly Ala Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe Lys	
	225 230 235 240	
75	tca gac aac cct gct aaa ttt gcg aaa gca att gtg gaa gca aca act	768
	Ser Asp Asn Pro Ala Lys Phe Ala Lys Ala Ile Val Glu Ala Thr Thr	
	245 250 255	
80	cac ttt act gat tac aaa tta atc gct gag ttg tca aaa gag ctt ggt	816



EP 1 893 675 B9

	His	Phe	Thr	Asp	Tyr	Lys	Leu	Ile	Ala	Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Leu	Gly	
				260					265					270			
5	act	gca	atg	aaa	ggg	att	gaa	atc	tca	aac	tta	ctt	cca	gaa	cag	cgt	864
	Thr	Ala	Met	Lys	Gly	Ile	Glu	Ile	Ser	Asn	Leu	Leu	Pro	Glu	Gln	Arg	
			275					280					285				
	atg	caa	gaa	cgc	ggc	tgg	aga	tct	att	gaa	ggc	cgc	atg	aag	ttc	tcc	912
	Met	Gln	Glu	Arg	Gly	Trp	Arg	Ser	Ile	Glu	Gly	Arg	Met	Lys	Phe	Ser	
10			290				295					300					
	att	gct	gcc	gct	gtc	gtt	gct	ttc	gcc	gcc	tcc	gtc	gcg	gcc	ctc	cct	960
	Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Phe	Ala	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Leu	Pro	
	305					310					315				320		
	cct	gcc	cat	gat	tcc	cag	ttc	gct	ggc	aat	ggg	gtt	ggc	aac	aag	ggc	1008
15	Pro	Ala	His	Asp	Ser	Gln	Phe	Ala	Gly	Asn	Gly	Val	Gly	Asn	Lys	Gly	
				325						330					335		
	aac	agc	aac	gtc	aag	ttc	cct	gtc	ccc	gaa	aac	gtg	acc	gtc	aag	cag	1056
	Asn	Ser	Asn	Val	Lys	Phe	Pro	Val	Pro	Glu	Asn	Val	Thr	Val	Lys	Gln	
20				340					345					350			
	gcc	tcc	gac	aag	tgc	ggg	gac	cag	gcc	cag	ctc	tct	tgc	tgc	aac	aag	1104
	Ala	Ser	Asp	Lys	Cys	Gly	Asp	Gln	Ala	Gln	Leu	Ser	Cys	Cys	Asn	Lys	
			355				360						365				
	gcc	acg	tac	gcc	ggg	gac	acc	aca	acc	gtt	gat	gag	ggg	ctt	ctg	tct	1152
25	Ala	Thr	Tyr	Ala	Gly	Asp	Thr	Thr	Thr	Val	Asp	Glu	Gly	Leu	Leu	Ser	
		370				375						380					
	ggg	gcc	ctc	agc	ggc	ctc	atc	ggc	gcc	ggg	tct	ggg	gcc	gaa	ggg	ctt	1200
	Gly	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Ala	Glu	Gly	Leu	
30		385			390						395				400		
	ggg	ctc	ttc	gat	cag	tgc	tcc	aag	ctt	gat	gtt	gct	gtc	ctc	att	ggc	1248
	Gly	Leu	Phe	Asp	Gln	Cys	Ser	Lys	Leu	Asp	Val	Ala	Val	Leu	Ile	Gly	
				405					410					415			
	atc	caa	gat	ctt	gtc	aac	cag	aag	tgc	aag	caa	aac	att	gcc	tgc	tgc	1296
35	Ile	Gln	Asp	Leu	Val	Asn	Gln	Lys	Cys	Lys	Gln	Asn	Ile	Ala	Cys	Cys	
			420					425					430				
	cag	aac	tcc	ccc	tcc	agc	gcg	gat	ggc	aac	ctt	att	ggg	gtc	ggg	ctc	1344
	Gln	Asn	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Asp	Gly	Asn	Leu	Ile	Gly	Val	Gly	Leu	
			435				440						445				
40	cct	tgc	gtt	gcc	ctt	ggc	tcc	atc	ctc	gga	tct	cat	cac	cat	cac	cat	1392
	Pro	Cys	Val	Ala	Leu	Gly	Ser	Ile	Leu	Gly	Ser	His	His	His	His	His	
		450				455						460					
	cac																1395
45	His																
	465																

<210> 22

<211> 465

50 <212> PRT

<213> basf-yaad-Xa-rodA-his

<400> 22

55

# EP 1 893 675 B9

	Met	Ala	Gln	Thr	Gly	Thr	Glu	Arg	Val	Lys	Arg	Gly	Met	Ala	Glu	Met	
	1				5					10					15		
5	Gln	Lys	Gly	Gly	Val	Ile	Met	Asp	Val	Ile	Asn	Ala	Glu	Gln	Ala	Lys	
				20					25					30			
	Ile	Ala	Glu	Glu	Ala	Gly	Ala	Val	Ala	Val	Met	Ala	Leu	Glu	Arg	Val	
10				35				40					45				
	Pro	Ala	Asp	Ile	Arg	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Arg	Met	Ala	Asp	Pro	
		50					55					60					
15	Thr	Ile	Val	Glu	Glu	Val	Met	Asn	Ala	Val	Ser	Ile	Pro	Val	Met	Ala	
	65					70					75					80	
	Lys	Ala	Arg	Ile	Gly	His	Ile	Val	Glu	Ala	Arg	Val	Leu	Glu	Ala	Met	
20					85					90					95		
	Gly	Val	Asp	Tyr	Ile	Asp	Glu	Ser	Glu	Val	Leu	Thr	Pro	Ala	Asp	Glu	
				100					105					110			
25	Glu	Phe	His	Leu	Asn	Lys	Asn	Glu	Tyr	Thr	Val	Pro	Phe	Val	Cys	Gly	
			115					120					125				
	Cys	Arg	Asp	Leu	Gly	Glu	Ala	Thr	Arg	Arg	Ile	Ala	Glu	Gly	Ala	Ser	
30		130					135					140					
	Met	Leu	Arg	Thr	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Thr	Gly	Asn	Ile	Val	Glu	Ala	
	145					150					155					160	
35	Val	Arg	His	Met	Arg	Lys	Val	Asn	Ala	Gln	Val	Arg	Lys	Val	Val	Ala	
					165					170					175		
	Met	Ser	Glu	Asp	Glu	Leu	Met	Thr	Glu	Ala	Lys	Asn	Leu	Gly	Ala	Pro	
40				180					185					190			
	Tyr	Glu	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Lys	Lys	Asp	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Val	
			195					200					205				
45	Asn	Phe	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Thr	Pro	Ala	Asp	Ala	Ala	Leu	Met	
		210					215					220					
	Met	Gln	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Phe	Val	Gly	Ser	Gly	Ile	Phe	Lys	
50		225				230					235					240	
	Ser	Asp	Asn	Pro	Ala	Lys	Phe	Ala	Lys	Ala	Ile	Val	Glu	Ala	Thr	Thr	
					245					250					255		
55	His	Phe	Thr	Asp	Tyr	Lys	Leu	Ile	Ala	Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Leu	Gly	
				260					265					270			

# EP 1 893 675 B9

	Thr	Ala	Met	Lys	Gly	Ile	Glu	Ile	Ser	Asn	Leu	Leu	Pro	Glu	Gln	Arg	
			275					280					285				
5	Met	Gln	Glu	Arg	Gly	Trp	Arg	Ser	Ile	Glu	Gly	Arg	Met	Lys	Phe	Ser	
		290					295					300					
	Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Phe	Ala	Ala	Ser	Val	Ala	Ala	Leu	Pro	
10	305					310					315					320	
	Pro	Ala	His	Asp	Ser	Gln	Phe	Ala	Gly	Asn	Gly	Val	Gly	Asn	Lys	Gly	
					325					330					335		
15	Asn	Ser	Asn	Val	Lys	Phe	Pro	Val	Pro	Glu	Asn	Val	Thr	Val	Lys	Gln	
				340					345					350			
	Ala	Ser	Asp	Lys	Cys	Gly	Asp	Gln	Ala	Gln	Leu	Ser	Cys	Cys	Asn	Lys	
20			355					360					365				
	Ala	Thr	Tyr	Ala	Gly	Asp	Thr	Thr	Thr	Val	Asp	Glu	Gly	Leu	Leu	Ser	
		370					375					380					
25	Gly	Ala	Leu	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Ala	Glu	Gly	Leu	
	385					390					395					400	
	Gly	Leu	Phe	Asp	Gln	Cys	Ser	Lys	Leu	Asp	Val	Ala	Val	Leu	Ile	Gly	
30					405					410					415		
	Ile	Gln	Asp	Leu	Val	Asn	Gln	Lys	Cys	Lys	Gln	Asn	Ile	Ala	Cys	Cys	
				420					425					430			
35	Gln	Asn	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Asp	Gly	Asn	Leu	Ile	Gly	Val	Gly	Leu	
			435					440					445				
	Pro	Cys	Val	Ala	Leu	Gly	Ser	Ile	Leu	Gly	Ser	His	His	His	His	His	
40		450					455					460					
	His																
	465																
45	<210>	23															
	<211>	1407															
	<212>	DNA															
	<213>	basf-yaad-Xa-BASF1-his															
50	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(1)..(1407)															
	<223>																
55	<400>	23															

EP 1 893 675 B9

	atg gct caa aca ggt act gaa cgt gta aaa cgc gga atg gca gaa atg	48
	Met Ala Gln Thr Gly Thr Glu Arg Val Lys Arg Gly Met Ala Glu Met	
	1 5 10 15	
5	caa aaa ggc ggc gtc atc atg gac gtc atc aat gcg gaa caa gcg aaa	96
	Gln Lys Gly Gly Val Ile Met Asp Val Ile Asn Ala Glu Gln Ala Lys	
	20 25 30	
	atc gct gaa gaa gct gga gct gtc gct gta atg gcg cta gaa cgt gtg	144
	Ile Ala Glu Glu Ala Gly Ala Val Ala Val Met Ala Leu Glu Arg Val	
10	35 40 45	
	cca gca gat att cgc gcg gct gga gga gtt gcc cgt atg gct gac cct	192
	Pro Ala Asp Ile Arg Ala Ala Gly Gly Val Ala Arg Met Ala Asp Pro	
	50 55 60	
15	aca atc gtg gaa gaa gta atg aat gca gta tct atc ccg gta atg gca	240
	Thr Ile Val Glu Glu Val Met Asn Ala Val Ser Ile Pro Val Met Ala	
	65 70 75 80	
	aaa gcg cgt atc gga cat att gtt gaa gcg cgt gtg ctt gaa gct atg	288
	Lys Ala Arg Ile Gly His Ile Val Glu Ala Arg Val Leu Glu Ala Met	
20	85 90 95	
	ggg gtt gac tat att gat gaa agt gaa gtt ctg acg ccg gct gac gaa	336
	Gly Val Asp Tyr Ile Asp Glu Ser Glu Val Leu Thr Pro Ala Asp Glu	
	100 105 110	
25	gaa ttt cat tta aat aaa aat gaa tac aca gtt cct ttt gtc tgt ggc	384
	Glu Phe His Leu Asn Lys Asn Glu Tyr Thr Val Pro Phe Val Cys Gly	
	115 120 125	
	tgc cgt gat ctt ggt gaa gca aca cgc cgt att gcg gaa ggt gct tct	432
	Cys Arg Asp Leu Gly Glu Ala Thr Arg Arg Ile Ala Glu Gly Ala Ser	
30	130 135 140	
	atg ctt cgc aca aaa ggt gag cct gga aca ggt aat att gtt gag gct	480
	Met Leu Arg Thr Lys Gly Glu Pro Gly Thr Gly Asn Ile Val Glu Ala	
	145 150 155 160	
35	gtt cgc cat atg cgt aaa gtt aac gct caa gtg cgc aaa gta gtt gcg	528
	Val Arg His Met Arg Lys Val Asn Ala Gln Val Arg Lys Val Val Ala	
	165 170 175	
	atg agt gag gat gag cta atg aca gaa gcg aaa aac cta ggt gct cct	576
	Met Ser Glu Asp Glu Leu Met Thr Glu Ala Lys Asn Leu Gly Ala Pro	
40	180 185 190	
	tac gag ctt ctt ctt caa att aaa aaa gac ggc aag ctt cct gtc gtt	624
	Tyr Glu Leu Leu Leu Gln Ile Lys Lys Asp Gly Lys Leu Pro Val Val	
	195 200 205	
	aac ttt gcc gct ggc ggc gta gca act cca gct gat gct gct ctc atg	672
	Asn Phe Ala Ala Gly Gly Val Ala Thr Pro Ala Asp Ala Ala Leu Met	
45	210 215 220	
	atg cag ctt ggt gct gac gga gta ttt gtt ggt tct ggt att ttt aaa	720
	Met Gln Leu Gly Ala Asp Gly Val Phe Val Gly Ser Gly Ile Phe Lys	
50	225 230 235 240	
	tca gac aac cct gct aaa ttt gcg aaa gca att gtg gaa gca aca act	768
	Ser Asp Asn Pro Ala Lys Phe Ala Lys Ala Ile Val Glu Ala Thr Thr	
	245 250 255	
55		

EP 1 893 675 B9

	cac ttt act gat tac aaa tta atc gct gag ttg tca aaa gag ctt ggt	816
	His Phe Thr Asp Tyr Lys Leu Ile Ala Glu Leu Ser Lys Glu Leu Gly	
	260 265 270	
5	act gca atg aaa ggg att gaa atc tca aac tta ctt cca gaa cag cgt	864
	Thr Ala Met Lys Gly Ile Glu Ile Ser Asn Leu Leu Pro Glu Gln Arg	
	275 280 285	
10	atg caa gaa cgc ggc tgg aga tct att gaa ggc cgc atg aag ttc tcc	912
	Met Gln Glu Arg Gly Trp Arg Ser Ile Glu Gly Arg Met Lys Phe Ser	
	290 295 300	
15	gtc tcc gcc gcc gtc ctc gcc ttc gcc gcc tcc gtc gcc gcc ctc cct	960
	Val Ser Ala Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ser Val Ala Ala Leu Pro	
	305 310 315 320	
20	cag cac gac tcc gcc gcc ggc aac ggc aac ggc gtc ggc aac aag ttc	1008
	Gln His Asp Ser Ala Ala Gly Asn Gly Asn Gly Val Gly Asn Lys Phe	
	325 330 335	
25	cct gtc cct gac gac gtc acc gtc aag cag gcc acc gac aag tgc ggc	1056
	Pro Val Pro Asp Asp Val Thr Val Lys Gln Ala Thr Asp Lys Cys Gly	
	340 345 350	
30	gac cag gcc cag ctc tcc tgc tgc aac aag gcc acc tac gcc ggc gac	1104
	Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys Asn Lys Ala Thr Tyr Ala Gly Asp	
	355 360 365	
35	gtc ctc acc gac atc gac gag ggc atc ctc gcc ggc ctc ctc aag aac	1152
	Val Leu Thr Asp Ile Asp Glu Gly Ile Leu Ala Gly Leu Leu Lys Asn	
	370 375 380	
40	ctc atc ggc ggc ggc tcc ggc tcc gag ggc ctc ggc ctc ttc gac cag	1200
	Leu Ile Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Gly Leu Gly Leu Phe Asp Gln	
	385 390 395 400	
45	tgc gtc aag ctc gac ctc cag atc tcc gtc atc ggc atc cct atc cag	1248
	Cys Val Lys Leu Asp Leu Gln Ile Ser Val Ile Gly Ile Pro Ile Gln	
	405 410 415	
50	gac ctc ctc aac cag gtc aac aag cag tgc aag cag aac atc gcc tgc	1296
	Asp Leu Leu Asn Gln Val Asn Lys Gln Cys Lys Gln Asn Ile Ala Cys	
	420 425 430	
55	tgc cag aac tcc cct tcc gac gcc acc ggc tcc ctc gtc aac ctc ggc	1344
	Cys Gln Asn Ser Pro Ser Asp Ala Thr Gly Ser Leu Val Asn Leu Gly	
	435 440 445	
60	ctc ggc aac cct tgc atc cct gtc tcc ctc ctc cat atg gga tct cat	1392
	Leu Gly Asn Pro Cys Ile Pro Val Ser Leu Leu His Met Gly Ser His	
	450 455 460	
65	cac cat cac cat cac	1407
	His His His His His	
	465	

<210> 24

<211> 469

<212> PRT

<213> basf-yaad-Xa-BASF1-his

<400> 24

# EP 1 893 675 B9

	Met	Ala	Gln	Thr	Gly	Thr	Glu	Arg	Val	Lys	Arg	Gly	Met	Ala	Glu	Met	
	1				5					10					15		
5																	
	Gln	Lys	Gly	Gly	Val	Ile	Met	Asp	Val	Ile	Asn	Ala	Glu	Gln	Ala	Lys	
				20					25					30			
10	Ile	Ala	Glu	Glu	Ala	Gly	Ala	Val	Ala	Val	Met	Ala	Leu	Glu	Arg	Val	
			35					40						45			
	Pro	Ala	Asp	Ile	Arg	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Arg	Met	Ala	Asp	Pro	
		50					55					60					
15																	
	Thr	Ile	Val	Glu	Glu	Val	Met	Asn	Ala	Val	Ser	Ile	Pro	Val	Met	Ala	
	65					70					75					80	
	Lys	Ala	Arg	Ile	Gly	His	Ile	Val	Glu	Ala	Arg	Val	Leu	Glu	Ala	Met	
20					85					90					95		
	Gly	Val	Asp	Tyr	Ile	Asp	Glu	Ser	Glu	Val	Leu	Thr	Pro	Ala	Asp	Glu	
				100					105						110		
25																	
	Glu	Phe	His	Leu	Asn	Lys	Asn	Glu	Tyr	Thr	Val	Pro	Phe	Val	Cys	Gly	
			115					120					125				
	Cys	Arg	Asp	Leu	Gly	Glu	Ala	Thr	Arg	Arg	Ile	Ala	Glu	Gly	Ala	Ser	
30		130					135					140					
	Met	Leu	Arg	Thr	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Thr	Gly	Asn	Ile	Val	Glu	Ala	
	145					150					155					160	
35																	
	Val	Arg	His	Met	Arg	Lys	Val	Asn	Ala	Gln	Val	Arg	Lys	Val	Val	Ala	
					165					170					175		
	Met	Ser	Glu	Asp	Glu	Leu	Met	Thr	Glu	Ala	Lys	Asn	Leu	Gly	Ala	Pro	
40				180					185					190			
	Tyr	Glu	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Lys	Lys	Asp	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Val	
			195					200					205				
45																	
	Asn	Phe	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Thr	Pro	Ala	Asp	Ala	Ala	Leu	Met	
		210					215					220					
	Met	Gln	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Phe	Val	Gly	Ser	Gly	Ile	Phe	Lys	
50		225				230					235					240	
	Ser	Asp	Asn	Pro	Ala	Lys	Phe	Ala	Lys	Ala	Ile	Val	Glu	Ala	Thr	Thr	
					245					250					255		
55																	
	His	Phe	Thr	Asp	Tyr	Lys	Leu	Ile	Ala	Glu	Leu	Ser	Lys	Glu	Leu	Gly	
				260					265					270			

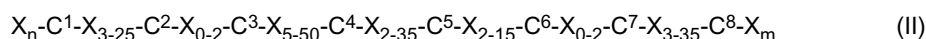
5 Thr Ala Met Lys Gly Ile Glu Ile Ser Asn Leu Leu Pro Glu Gln Arg  
 275 280 285  
 Met Gln Glu Arg Gly Trp Arg Ser Ile Glu Gly Arg Met Lys Phe Ser  
 290 295 300  
 10 Val Ser Ala Ala Val Leu Ala Phe Ala Ala Ser Val Ala Ala Leu Pro  
 305 310 315 320  
 Gln His Asp Ser Ala Ala Gly Asn Gly Asn Gly Val Gly Asn Lys Phe  
 325 330 335  
 15 Pro Val Pro Asp Asp Val Thr Val Lys Gln Ala Thr Asp Lys Cys Gly  
 340 345 350  
 Asp Gln Ala Gln Leu Ser Cys Cys Asn Lys Ala Thr Tyr Ala Gly Asp  
 355 360 365  
 20 Val Leu Thr Asp Ile Asp Glu Gly Ile Leu Ala Gly Leu Leu Lys Asn  
 370 375 380  
 25 Leu Ile Gly Gly Gly Ser Gly Ser Glu Gly Leu Gly Leu Phe Asp Gln  
 385 390 395 400  
 Cys Val Lys Leu Asp Leu Gln Ile Ser Val Ile Gly Ile Pro Ile Gln  
 405 410 415  
 30 Asp Leu Leu Asn Gln Val Asn Lys Gln Cys Lys Gln Asn Ile Ala Cys  
 420 425 430  
 35 Cys Gln Asn Ser Pro Ser Asp Ala Thr Gly Ser Leu Val Asn Leu Gly  
 435 440 445  
 40 Leu Gly Asn Pro Cys Ile Pro Val Ser Leu Leu His Met Gly Ser His  
 450 455 460  
 His His His His His  
 465

# Patentansprüche

- 50 1. Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel mit einer Beschichtung enthaltend Hydrophobin.
2. Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Beschichtung 1 bis 5000 ppm Hydrophobin, bezogen auf das thermoplastische Polymer, enthält.
- 55 3. Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** das thermoplastische Polymer aus Polystyrol oder Polyolefin besteht.
4. Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch**

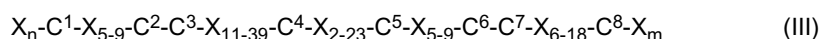
**gekennzeichnet, das** sie einen mittleren Teilchendurchmesser im Bereich von 0,05 bis 5 mm aufweisen.

5. Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Beschichtung ein Hydrophobin der allgemeinen Formel (II)



enthält, wobei X für jede der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren steht, n und m für Zahlen zwischen 0 und 500 stehen, C für Cystein steht.

6. Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Beschichtung ein Hydrophobin der allgemeinen Formel (III)



enthält.

7. Expandierbare oder expandierte, thermoplastische Polymer-Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Beschichtung ein Hydrophobin des Typs dewA, rodA, hjypA, hypB, sc3, basf1 oder basf2 enthält.

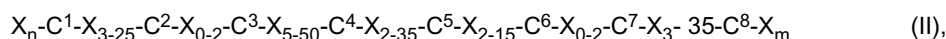
8. Verfahren zur Beschichtung von expandierbaren oder expandierten, thermoplastischen Polymer-Partikel, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die Oberfläche der Polymer-Partikel mit einer Hydrophobin-haltigen Lösung in Kontakt bringt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Hydrophobin-haltige Lösung eine wässrige Lösung mit einer Konzentration von 1 bis 100 g/l Hydrophobin und einem pH-Wert im Bereich von 5 bis 9 verwendet wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, dass** man die Oberfläche mit der Hydrophobin-haltige Lösung bei einer Temperatur im Bereich von 0 bis 140°C in Kontakt bringt.

## Claims

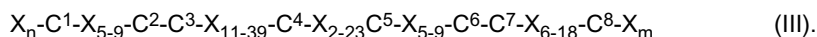
1. An expandable or expanded, thermoplastic polymer particle with a coating comprising hydrophobin.
2. The expandable or expanded, thermoplastic polymer particle according to claim 1, wherein the coating comprises from 1 to 5000 ppm of hydrophobin, based on the thermoplastic polymer.
3. The expandable or expanded, thermoplastic polymer particle according to claim 1, wherein the thermoplastic polymer consists of polystyrene or polyolefin.
4. The expandable or expanded, thermoplastic polymer particle according to any of claims 1 to 3, which has an average particle diameter in the range of 0.05 to 5 mm.
5. The expandable or expanded, thermoplastic polymer particle according to any of claims 1 to 4, wherein the coating comprises a hydrophobin of the general formula (II)



where X is any of the 20 naturally occurring amino acids, n and m are numbers between 0 and 500, C is cysteine.

6. The expandable or expanded, thermoplastic polymer particle according to claim 4, wherein the coating comprises a hydrophobin of the general formula (III)

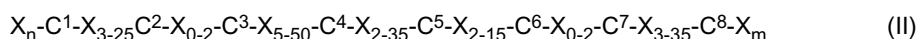




7. The expandable or expanded, thermoplastic polymer particle according to any of claims 1 to 4, wherein the coating comprises a dewA, rodA, hjypA, hypB, sc3, basf1 or basf2 type hydrophobin.
8. A process for coating expandable or expanded, thermoplastic polymer particles, wherein the surface of the polymer particles is contacted with a hydrophobin-containing solution.
9. The process according to any of claims 1 to 4, wherein the hydrophobin-containing solution used is an aqueous solution with a hydrophobin concentration of from 1 to 100 g/l and a pH in the range of 5 to 9.
10. The process according to any of claims 1 to 5, wherein the surface is contacted with the hydrophobin-containing solution at a temperature in the range of 0 to 140 °C.

## Revendications

1. Particules polymères expansibles ou expansées, thermoplastiques, présentant un revêtement contenant de l'hydrophobine.
2. Particules polymères expansibles ou expansées, thermoplastiques, selon la revendication 1, **caractérisées en ce que** le revêtement contient 1 à 5000 ppm d'hydrophobine, par rapport au polymère thermoplastique.
3. Particules polymères expansibles ou expansées, thermoplastiques, selon la revendication 1, **caractérisées en ce que** le polymère thermoplastique est constitué par un polystyrène ou une polyoléfine.
4. Particules polymères expansibles ou expansées, thermoplastiques, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, **caractérisées en ce qu'elles** présentent un diamètre moyen des particules dans la plage de 0,05 à 5 mm.
5. Particules polymères expansibles ou expansées, thermoplastiques, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, **caractérisées en ce que** le revêtement contient une hydrophobine de formule générale (II)



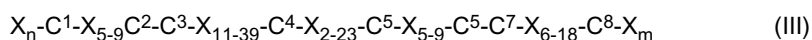
dans laquelle

X représente chacun des 20 acides aminés naturels,

n et m représentent des nombres entre 0 et 500,

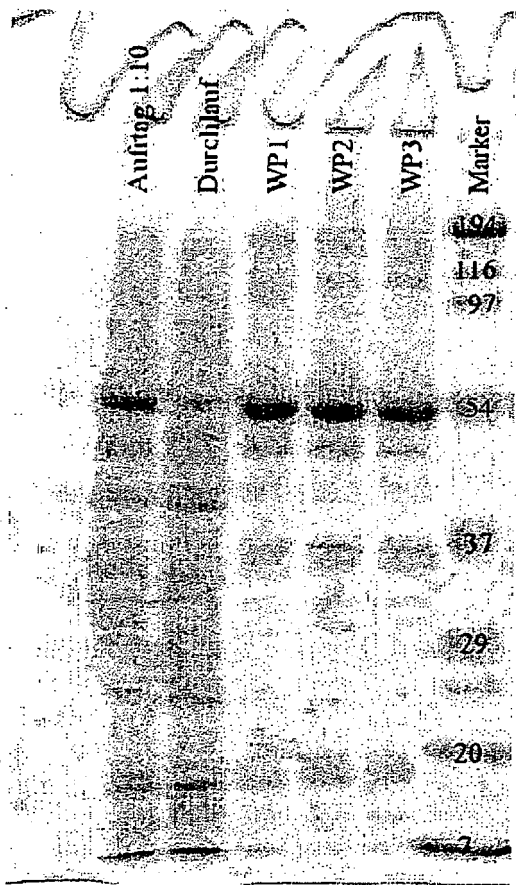
C représente la cystéine.

6. Particules polymères expansibles ou expansées, thermoplastiques, selon la revendication 4, **caractérisées en ce que** le revêtement contient une hydrophobine de formule générale (III)



7. Particules polymères expansibles ou expansées, thermoplastiques, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, **caractérisées en ce que** le revêtement contient une hydrophobine du type dewA, rodA, hjypA, hypB, sc3, basf1 ou basf2.
8. Procédé pour le revêtement de particules polymères expansibles ou expansées, thermoplastiques, **caractérisé en ce qu'on** met la surface des particules polymères en contact avec une solution contenant de l'hydrophobine.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, **caractérisé en ce qu'on** utilise comme solution contenant de l'hydrophobine une solution aqueuse présentant une concentration de 1 à 100 g/l d'hydrophobine et un pH dans la plage de 5 à 9.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, **caractérisé en ce qu'on** met la surface en contact avec la solution contenant de l'hydrophobine à une température dans la plage de 0 à 140°C.

Abbildung 1



## IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

### In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- EP 470455 A [0003]
- DE 102005007480 [0006] [0042]
- WO 9641882 A [0008] [0041]
- WO 0157528 A [0009]
- WO 0353383 A [0010]
- WO 0310331 A [0011]

### In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **WESSELS et al.** *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1994, vol. 32, 413-437 [0035]
- **WÖSTEN.** *Eur. J Cell Bio.*, 1994, vol. 63, 122-129 [0041]
- **GOEDDEL.** *Gene Expression Technology : Methods in Enzymology.* Academic Press, 1990, 185 [0047]
- Buch Cloning Vectors. Elsevier, 1985 [0054]
- **T. MANIATIS ; E. F. FRITSCH ; J. SAMBROOK.** *Molecular Cloning : A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0060]
- **T. J. SILHAVY ; M. L. BERMAN ; L. W. ENQUIST.** *Experiments with Gene Fusions.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1984 [0060]
- **AUSUBEL, F. M. et al.** *Current Protocols in Molecular Biology.* Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, 1987 [0060]
- **POUWELS P. H. et al.** *Cloning Vectors.* Elsevier, 1985 [0061]
- **F. AUSUBEL et al.** *Molecular Biology.* Wiley Interscience, 1997 [0062]
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning : A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0062]
- **THOMAS, K. R. ; CAPECCHI, M. R.** *Cell*, 1987, vol. 51, 503 [0063]
- **T. MANIATIS ; E. F. FRITSCH ; J. SAMBROOK.** *Molecular Cloning : A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0066]
- **HARLOW, E. ; LANE, D.** *Antibodies : A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor (N. Y. ) Press, 1988 [0069]