(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2006 020 148 A1** 2007.11.08

(12) # Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2006 020 148.5**
(22) Anmeldetag: **02.05.2006**
(43) Offenlegungstag: **08.11.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C07K 14/435*** (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

(71) Anmelder:
Universität Bremen, 28359 Bremen, DE

(74) Vertreter:
Huber & Schüssler, 81825 München

(72) Erfinder:
Blohm, Dietmar, Prof. Dr., 27711 Osterholz-Scharmbeck, DE; Zeng, Junqing, 28199 Bremen, DE; Fritz, Monika, Dr., 28870 Ottersberg, DE; Grathwohl, Georg, Prof. Dr., 28207 Bremen, DE

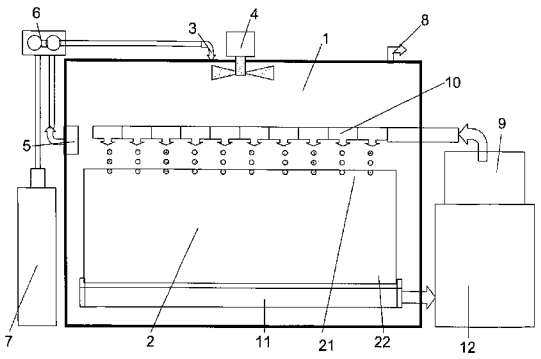
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
MANN, K., WEISS, I.M., ANDRE, S. [u.a.]: The amino-acid sequence of the abalone (Haliotis laevigata) nacre protein perlucin, 2000, In: Eur. J. Biochem., Vol. 267, S. 5257-5264;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Gentechnisch hergestelltes Perlucin und seine Verwendung zur Herstellung von Biomaterialien**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft rekombinant hergestelltes Perlucin, Nukleinsäuren, die das Perlucin kodieren, sowie ein Verfahren zur Herstellung von Biomineralien unter Verwendung des rekombinanten Perlucins.



Beschreibung

Technisches Gebiet:

[0001] Die Erfindung betrifft rekombinant hergestelltes Perlucin, Nukleinsäuren die das Perlucin kodieren, sowie die Verwendung des Perlucins zur Herstellung von Biomaterialien.

Stand der Technik:

[0002] Damit Biomineralien, die als Hauptkomponenten vieler Werkstoffe bisher überwiegend aus biologischen Quelle gewonnen werden, den Anforderungen moderner Werkstoffe angepasst werden können, ist ihre Herstellung auf biotechnischem Wege erforderlich. Das trifft in besonderem Maße für biokeramische Werkstoffe zu, die im Tierreich weit verbreitet sind. Gut bekannte Beispiele sind die Kalk-Skelette diverser einzelliger Lebewesen, die Gehäuse von Schnecken, Eierschalen, die Schalen von Muscheln einschließlich ihrer wertvollen Perlen sowie Knochen und Zähne von Säugetieren. Diese biomineralischen Strukturen bestehen überwiegend aus biokeramischen Bestandteilen. Ihre technisch besonders interessanten Eigenschaften als Verbundwerkstoffe sind meist durch organische Polymere oder zelluläre Komponenten bestimmt, die oft nur in sehr geringen Mengen enthalten sind. Perlmutt und andere $CaCO_3$-basierte Biomineralien sind typische Beispiele, die in jüngster Zeit viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen haben, weil sie aufgrund ihrer exzellenten physikalisch-chemischen Eigenschaften als „high-performance" Werkstoffe, beispielsweise, für die Herstellung neuartiger Farben oder zur Oberflächenvergütung von anderen Werkstoffen von großem Interesse sind.

[0003] Biomineralien werden in vivo unter dem Einfluss bestimmter Proteine gebildet, die den Kristallisationsprozess der anorganischen Komponenten steuern (Fu, G. et al.; 2005, Advanced Materials 17: 2678-2683; Belcher et al., 1996, Nature 381: 56-58; Falini et al., 1996, Science 271: 67-69; Thompson et al., 2000, Biophys. J. 79: 3307-3312). Etwa ein Dutzend solcher Proteine wurden aus Perlmutt und anderen Biomineralien isoliert. Zumindest von einem dieser Proteine, dem Perlucin, ist bekannt, dass es den Nukleationsprozess für die $CaCO_3$ Kristallform Calcit massiv verstärkt (Blank et al., 2003, Journal of Microscopy 212: 280-291; Weiss et al., 2000, BBRC 267: 17-21). Da dies vermutlich der erste Schritt zur Bildung von Perlmutt und anderen Biomineralien in vivo ist, wird Perlucin als potentieller Schlüssel für die biotechnische Herstellung von Perlmutt und anderen Biomineralien angesehen. Im biologischen Material ist Perlucin nur in extrem geringen Mengen enthalten und kann daraus in den für die biotechnische Herstellung von Biomineralien erforderlichen Mengen nicht gewonnen werden.

[0004] Mit Hilfe von Perlucin können Kristallformen erzeugt werden, die spontan nicht entstehen. Derartige „biomorphe" Kristallformen, deren Erzeugung für die biotechnische Herstellung der Biomineralien eine Voraussetzung darstellt, sind bisher aber in vitro nicht in nennenswerten Mengen herstellbar, sondern entstehen lediglich in analytischen Mengen, wenn die biologische Aktivität von Perlucin untersucht wird.

[0005] Aus Mann et al.; Eur. J. Biochem. 267 (2000), 5257-5264 ist eine unvollständige Aminosäuresequenz von Perlucin bekannt, die über die PIR Datenbank (PIR-International, Munich Information Centre for Protein Sequences, MIPS) unter der Nummer S78774 zugänglich ist. Diese Aminosäuresequenz von Perlucin ist allerdings in 12 der 155 Positionen nicht definiert, weil die Analysen an diesen Stellen 2 oder sogar 3 Alternativ-Aminosäuren ergeben (Mann et al., 2000). Es ist deshalb unklar, ob natürliches Perlucin vielleicht nur als Gemisch verschiedener (wenn auch ähnlicher) Proteine aktiv ist, oder ob eine einzige der 6.144 potentiell vorhandenen Sequenz-Varianten für die biologische Aktivität ausreicht. Aufgrund dieses Umstandes ist die Isolierung eines Perlucin-Gens offenbar noch nicht gelungen.

[0006] Perlucin konnte für die biotechnische Herstellung von Biomineralien bisher nicht eingesetzt werden, weil es aus natürlichen Quellen nicht in ausreichender Menge gewonnen werden kann und weil für seine gentechnische Herstellung entscheidende Voraussetzungen, wie z.B. die Kenntnis des exakten Gens oder die eindeutige Aminosäure-Sequenz des Proteins, fehlten. Mann et al., (2000) ist nicht zu entnehmen, welche der 6.144 möglichen Genvarianten biologisch aktiv ist.

Beschreibung der Erfindung:

[0007] Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, rekombinantes, biologisch aktives Perlucin bereitzustellen, so dass Perlucin gentechnisch hergestellt und für die biotechnische Herstellung von Biomineralien eingesetzt werden kann.

[0008] Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die in den Patentansprüchen definierten Gegenstände gelöst.

[0009] Durch die vorliegende Erfindung wird erstmals auf gentechnischem Wege und damit in unbegrenzter Menge herstellbares Perlucin bereitgestellt, das für die biotechnische Herstellung von Biomineralien verwendet werden kann. Die Erfindung beschreibt erstmals eine eindeutige Aminosäuresequenz mit biologischer Aktivität sowie die dazugehörige DNA-Sequenz.

[0010] Ein Vorteil der Erfindung ist, dass mit Hilfe des rekombinanten Perlucins gemäß der Erfindung

eine zig-tausendfach gesteigerte Nukleation bei der Kristallisation von Calciumcarbonat in den Strukturen des Calcits erzeugt werden kann, so dass anstelle der ansonsten gebildeten Kristalle neuartige Kristallformen entstehen.

[0011] Ferner haben die Erfinder überraschend gefunden, dass Perlucin trotz der 6 Cystein-Reste und der bekannten Glykosylierungsstelle in Position 84 der SEQ ID NO:3 des nativen Perlucins, in E. coli in biologisch aktiver Form erhalten wird und nicht in einem eukaryotischen Wirtssystem exprimiert zu werden braucht.

[0012] Ausgehend von der in Mann et al. (2000) beschriebenen unvollständigen Aminosäuresequenz für Perlucin wurde eine Genbank synthetischer Gene konstruiert, die für die optimale Expression in E. coli ausgelegt ist. Von den 6.144 möglichen Genvarianten gemäß Mann et al. (2000) wurde aufgrund der zu erwartenden proteinchemischen Eigenschaften, eine begrenzte Anzahl von 32 bis 256 Varianten an Aminosäuresequenzen ausgewählt.

[0013] Die Herstellung der Genbank erfolgt nach allgemein bekannten gentechnischen Standardmethoden durch Einklonieren der synthetisch hergestellten Gene in geeignete Expressionsvektoren, beispielsweise in einen Vektor der pET-Reihe (Seed, 1987, Nature 329:840) und anschließende Transformation in geeignete Wirtszellen, wie in diesem Falle z.B. in den E.coli Stamm BL21 DE3 (Phillips et al., J. Bacteriol. 159:283-287). Nach der Selektion von erfolgreich transformierten Klonen wurde nach Klonen gescreent, die funktionelle Gen-Konstrukte enthalten und exprimieren, wobei das Screening auf die Isolierung des Proteins und dessen Testung auf seine, die Kristallstruktur beeinflussende Wirkung hin ausgelegt war. Außerdem war zu berücksichtigen, dass die Cystin-Brücken des Perlucins in E. coli i.d.R. nicht korrekt gebildet werden, so dass De- und Renaturierungsschritte in das Screening einzubeziehen waren.

[0014] Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Nukleinsäuremolekül, das für Perlucin bzw. ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität von Perlucin kodiert, und ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

(a) einem Nukleinsäuremolekül, das für ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2 kodiert;

(b) einem Nukleinsäuremolekül, das die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 umfasst;

(c) einem Nukleinsäuremolekül, das ein Polypeptid mit einer Sequenz, die zumindest 60% identisch mit der Sequenz der SEQ ID NO:2 ist, kodiert;

(d) einem Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz, die sich von der Nukleotidsequenz eines der Nukleinsäuremoleküle von (a), (b) oder (c) durch die Degeneration des genetischen Codes unterscheidet;

(e) einem Nukleinsäuremolekül, das ein Fragment oder eine allelische Variation eines Nukleinsäuremoleküls von (a), (b), (c) oder (d) ist.

[0015] Unter der biologischen Aktivität von Perlucin wird die gemeinsame und erhöhte Ablagerung von $CaCO_3$, die Stimulierung von $CaCO_3$-Kristallwachstum in vitro und die Nukleation von $CaCO_3$-Kristallen in übersättigen Calciumkarbonatlösungen verstanden.

[0016] Eine erste Ausführungsform der Erfindung betrifft ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das für ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 bzw. der Fig. 2 kodiert.

[0017] Die Erfindung betrifft auch ein Nukleinsäuremolekül, das die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 bzw. der Fig. 1 umfasst.

[0018] Die Nukleinsäuremoleküle der Erfindung können sowohl DNA als auch RNA Moleküle sein. Geeignete DNA Moleküle sind zum Beispiel cDNA Moleküle. Da Organismen unterschiedliche Präferenzen für degenerierte Codons von Aminosäuren besitzen, kann die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz bevorzugt hinsichtlich der bevorzugten Codons des Syntheseapparats der Wirtszelle optimiert werden, um Limitierungen in der Expression zu vermeiden.

[0019] Die Erfindung betrifft zudem auch Nukleinsäuremoleküle, die eine Aminosäuresequenz kodieren, die eine Identität von zumindest 60% oder 70%, bevorzugt zumindest 80%, insbesondere bevorzugt von zumindest 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% oder 98% zu der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 bzw. Fig. 2 aufweisen. Derartige Nukleinsäuremoleküle sind gekennzeichnet durch Deletion, Substitution und/oder Insertion von Aminosäure-spezifischen Basen gegenüber der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 bzw. Fig. 2 oder können u.a. das Ergebnis einer Rekombination oder anderer Vorgänge sein, wie natürlich auftretende Variationen, z.B. Sequenzen von anderen Organismen, natürliche Mutationen oder durch spezifischen Mutagenese eingeführte Mutationen. Solche Nukleinsäuremoleküle können mit Nukleinsäuremolekülen der Erfindung, beispielsweise, durch Hybridisierung identifiziert und isoliert werden. Als Hybrdisierungsprobe können Nukleinsäuremoleküle mit der Sequenz der SEQ ID NO:1 oder Fragmente davon verwendet werden. Unter "Hybridisierung" werden übliche Hybridisierungsbedingungen verstanden, bevorzugt stringente Bedingungen, wie beschrieben, beispielsweise, in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

[0020] Die Nukleinsäuremoleküle der Erfindung umfassen auch Moleküle, die sich von den Molekülen mit den Sequenzen der SEQ ID NO:1 bzw. Fig. 1 aufgrund der Degeneration des genetischen Codes unterscheiden.

[0021] In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung umfassen die Nukleinsäuremoleküle der Erfindung auch Fragmente oder allelische Variationen der oben beschrieben Nukleinsäuremoleküle der Erfindung, die ein Polypeptid mit der biologischen Funktion des Perlucins kodieren. Die allelischen Varianten können entweder natürlich auftretende Varianten oder synthetisch hergestellte Varianten oder mit rekombinanten DNA Verfahren produzierte Varianten sein.

[0022] Ferner ist es mit üblichen molekularbiologischen Verfahren (siehe, z.B., Sambrook et al.) möglich, verschiedene Mutationen in die Nukleinsäuremoleküle der Erfindung einzubringen. Als Ergebnis können Perlucin Polypeptide mit modifizierten biologischen Eigenschaften hergestellt werden. Damit können Perlucin Mutanten mit modifizierten biologischen Eigenschaften hergestellt werden, die sich zur gezielten Herstellung neuer Kristallstrukturen und damit veränderter Eigenschaften der betreffenden Werkstoffe eignen. Eine Möglichkeit ist die Herstellung von Deletionsmutanten, die durch kontinuierliche Deletion vom 5'- oder 3' Ende der DNA Sequenz erhalten werden, und zu entsprechend verkürzten Polypeptiden führen. Eine andere Möglichkeit ist die Einführung von singulären Mutationen an Positionen, die die Aminosäuresequenz beeinflussen.

[0023] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Vektoren wie Plasmide, Cosmide, Viren oder Bakteriophagen, die eine erfindungsgemäße Nukleotidsequenz enthalten. Geeignete Vektoren sind dem Fachmann bekannt. Allgemeine, auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Konstruktion entsprechender Vektoren verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise in vitro-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie in vivo-Rekombinationsverfahren, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989), beschrieben sind.

[0024] Die vorliegende Erfindung betrifft auch die vorstehend beschriebenen Vektoren enthaltenden Wirtszellen. Zu diesen Wirtszellen zählen vorzugsweise prokaryotische Zellen, insbesondere E. coli. Geeignet sind aber auch eukaryotische Zellen wie Hefe, Schimmelpilze, Algen, Insektenzellen oder Säugetierzellen. Verfahren zur Transformation dieser Wirtszellen, zur phänotypischen Selektion von Transformanten und der Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Vektoren sind auf dem Fachgebiet bekannt.

[0025] Die Erfindung betrifft ferner ein rekombinantes Polypeptid mit den biologischen Eigenschaften von Periucin, das (a) von der Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 kodiert wird; (b) die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 umfasst; oder (c) ein Fragment oder Variante des Polypeptids von (a) oder (b) ist, das von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die mit einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

[0026] In einem bevorzugten Polypeptid der Erfindung ist die Base, die der Position 84 der SEQ ID NO:3 entspricht, nicht glykosyliertes Asparagin. In einem besonders bevorzugten Polypeptid der Erfindung sind außerdem die Basen, bezogen auf SEQ ID NO:3, der Position 9 Histidin, der Positionen 11, 131 und 145 Arginin und der Position 133 Serin.

[0027] In anderen bevorzugten Polypeptiden der Ertindung ist die Base, die der Position 84 der SEQ ID NO:3 entspricht, nicht glykosyliertes Asparagin sowie die Basen an Position 9 Asparagin, Position 11 und 145 Arginin, Position 131 Histidin und Position 133 Prolin; oder an Position 9 und 131 Histidin, Position 11 Arginin, Position 133 Serin und Position 145 Methionin; oder an Position 9 Histidin, Position 11 Glycin, Position 131 Arginin, Position 133 Prolin und Position 145 Methionin; oder an Position 9 Histidin, Positionen 11 und 131 Arginin, Position 133 Prolin und Postion 145 Methionin; oder an Position 9 Histidin, Position 11 Glycin, Position 131 Arginin, Position 133 Serin und Position 145 Methionin; oder an Position 9 und 131 Histidin, Position 11 Glycin, Position 133 Prolin und an Position 145 Methionin; oder an Position 9 Histidin, Positionen 11 und 131 Arginin, Position 133 Serin und Position 145 Methionin.

[0028] Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids mit den biologischen Eigenschaften von Perlucin, wobei die Wirtszelle gemäß der Erfindung unter den Bedingungen, die zu einer Expression des rekombinanten Proteins führen, kultiviert wird und danach das Perlucin gewonnen wird. Dazu wird die Wirtszelle, die einen Vektor gemäß der Erfindung enthält, in einem geeigneten Medium kultiviert, die Expression von Perlucin induziert und das gebildete rekombinante Perlucin nach bekannten Verfahren der Proteinchemie isoliert und gewonnen. Die Isolierung und Reinigung des rekombinanten Proteins kann mit konventionellen Verfahren, wie chromatographischen Verfahren, erfolgen.

[0029] Mit Hilfe von Dithioerythrit, Mercaptoethanol oder ähnlichen Cystin-Brücken spaltenden Substanzen wird das gewonnene rekombinante Perlucin denaturiert und per Dialyse stufenweise wieder renaturiert. Dabei kann man pro Liter Fermentationsbrühe

je nach gewähltem Vektor und Wirtsorganismus sowie in Abhängigkeit von der Effizienz der proteinchemischen Verfahren etwa 0,5 bis 15 g an rekombinantem Perlucin erhalten. In geeigneten Pufferlösungen wie z.B. 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 (PB) behält das so hergestellte Protein bei 4°C monatelang seine biologische Aktivität. Die spezifische Aktivität des so hergestellten Perlucins ist außerordentlich hoch, so dass die Aktivität selbst dann noch gemessen werden kann, wenn die Protein-Konzentration weniger als 0,1 Mikrogramm pro ml beträgt.

[0030] Methoden zur analytischen Messung dieser Aktivität sind gut bekannt (Addadi et al., 1985, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82:4110-4114). Die Messung kann im 50-100 µl Maßstab durchgeführt werden, indem eine wässrige, etwa 10 mM $CaCl_2$-Lösung mit oder ohne Protein in kleinen Schälchen etwa 24 Stunden lang einer Atmosphäre aus CO_2 und Ammoniak ausgesetzt wird, wobei der Ammoniak dem pH-Abfall entgegenwirkt, der ansonsten durch das Kohlendioxid verursacht würde. Die Struktur der gebildeten Kristalle kann schließlich rasterelektronenmikroskopisch und mit weiteren dem Fachmann bekannten mineralogischen Methoden untersucht werden.

[0031] Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Verwendung von Perlucin zur Herstellung von Biomineralien. Ein solches erfindungsgemäßes Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass eine $CaCl_2$-Lösung mit hinzugefügtem Perlucin als dünner, pH-regulierter Flüssigkeitsfilm, ggfs. auch in diskontinuierlichen Schüben über die Kristallisationsfläche geeigneter Platten in Gefäßen geleitet wird. Diese Platten sind offen zu einer Atmosphäre hin, in der die CO_2-Konzentration genau reguliert wird. Die Diffusionsgeschwindigkeit des Ammoniumcarbonat-Dampfs in die $CaCl_2$-Lösung beeinflusst die Entstehung und Morphologie der $CaCO_3$ Kristalle. Die Diffusionsgeschwindigkeit widerum wird durch Menge und Volumen des Proteins in der $CaCl_2$-Lösung beeinflusst. Gut geeignet für die Kristallisation sind, beispielsweise, Konzentrationen des rekombinanten Proteins von etwa 1 bis ungefähr 10 µm. Mit diesem erfindungsgemäßen Verfahren können in vorteilhafter Weise reproduzierbar Kristalle und Biomineralien hergestellt werden. Das war mit den bisher bekannten analytischen Messmethoden (z.B. Addadi et al., 1985) nicht möglich, da dabei auftretende Verdunstung, Änderungen von pH-Wert und Ionenzusammensetzung, lokale Konzentrationsschwankungen und weitere z.T. unwägbare Effekte ein „scale-up" zu einem Produktionsverfahren verhindern.

[0032] Die Erfindung betrifft somit auch eine Vorrichtung zur Herstellung von Biomineralien umfassend:

- ein gasdichtes Gefäß, in dem eine definierte CO_2-Atmosphäre einstellbar ist;
- eine, bevorzugt geneigte, temperierbare Platte als Kristallisationsoberfläche im Gefäß;
- eine Zuleitung für eine das Polypeptid nach Anspruch 7 enthaltende $CaCl_2$-Lösung in das Gefäß zur Verteilung dieser Lösung über die Platte; und
- eine Ableitung für die überschüssige Lösung aus dem Gefäß.

[0033] Durch die erfindungsgemäße Vorrichtung kann die Diffusionsgeschwindigkeit des Ammoniumcarbonat-Dampfes in die $CaCl_2$-Lösung geregelt und damit Bildung und Morphologie der CaCO3 Kristalle gezielt gesteuert werden. Vor allem ist damit eine reproduzierbare Herstellung von Kristallen und Biomineralien, insbesondere durch Induktion mit Perlucin gemäß der Erfindung, möglich.

[0034] Ein Beispiel für eine derartige erfindungsgemäße Vorrichtung zur Herstellung Perlucin-induzierter Biomaterialien mit dem oben beschriebenen Verfahren ist in Fig. 4 schematisch dargestellt. Fig. 4 zeigt ein gasdichtes Gefäß **1**, das eine temperierbare Platte **2** zur Kristallisation enthält. Die Platte **2** ist an der für die Kristallisation bestimmten Seite mit einer sehr glatten Oberfläche versehen und kann, beispielsweise, aus Glas gefertigt sein. Zur Kristallisation wird im Gehäuse eine definierte CO_2-Atmosphäre eingestellt. Hierzu wird ein definiertes CO_2-haltiges Gasgemisch, bevorzugt CO_2/Luft-Gemisch über die Zuleitung **3** in das Gefäß **1** eingeblasen und darin mit einem Ventilator **4** gleichmäßig verteilt. Die CO_2-Konzentration wird in der Gefäßatmosphäre mit Messfühlern **5**, bevorzugt kontinuierlich, gemessen, über die wiederum eine Gas-Mischbatterie **6** geregelt wird, die den CO_2-Gehalt im Gasstrom einstellt. Das CO_2 wird der Gas-Mischbatterie **6** von einer CO_2-Druckgasflasche **7** zugeleitet. Das Gefäß **1** verfügt außerdem über eine versperrbare Ableitung **8** für den Gasabstrom. Zur Kristallisation wird eine Perlucin-haltige $CaCl_2$-Lösung nach Einstellung des pH-Wertes aus einem Titrationsbehälter **12** in das Gefäß **1** mit einer Pumpe **9**, die durch das Flüssigkeitsniveau, die Zeitintervalle oder andere Parameter gesteuert wird, eingeleitet und darin mit einem Verteiler **10** über die glatte Oberfläche der temperierten Platte **2** verteilt, auf der dann die Kristalle wachsen. Die Platte **2** wird bevorzugt von der Rückseite – der Kristallisationsoberfläche abgewandten Seite – temperiert. Bevorzugt ist die Platte **2** im Gehäuse **1** geneigt angebracht, so dass beim Aufbringen der Perlucin-haltigen $CaCl_2$-Lösung an der oben zu liegen kommenden Kante **21** der Platte **2**, die Perlucin-haltieg $CaCl_2$-Lösung als dünner Film, gleichmäßig über die glatte Oberfläche der Platte **2** zur unten zu liegen kommenden Kante **22** der Platte **2** rinnen kann. Die überschüssige Perlucin-haltige $CaCl_2$-Lösung wird nach der Passage der glatten Oberfläche der Platte **2** in einem Ablauf **11**, der bevorzugt unterhalb der unten zu liegen kommenden Kante **22** der Platte **2** aufgefangen, gesammelt und abgeleitet. Die abgeleitete Lö-

sung wird dann wieder dem Titrationsbehälter **12** zugeführt, mit einer, bevorzugt kontinuierlichen, $Ca(OH)_2$ basierten pH-Titration erneut eingestellt und über die Pumpe **9** in das Gefäß **1** zurückgeführt. Alternativ, kann natürlich statt der Zirkulation auch stets neue Perlucin-haltige $CaCl_2$-Lösung verwendet werden. Das Verfahren kann abhängig von den Anforderungen 3 bis 36 Stunden oder länger betrieben werden. Je nach Größe der Vorrichtung können die gewachsenen Kristalle anschließend im mg- oder im g-Maßstab geerntet werden. Selbstverständlich ist diese beschriebene Vorrichtung nicht auf die Induktion von Biomineralien durch Perlucin beschränkt und kann auch für die Herstellung von anderen Biomineralien verwendet werden.

[0035] Somit kann das erfindungsgemäße rekombinante Perlucin, beispielsweise zur Beschichtung von Oberflächen verwendet werden und ggfs. in Kombination mit anderen, die Biomineralisation beeinflussenden Proteinen dazu dienen, neuartige Beschichtungen und Materialien zu generieren.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

[0036] Fig. 1 zeigt die Nukleotidsequenz von Klon 21.

[0037] Fig. 2 zeigt die Aminosäuresequenz von Klon 21.

[0038] Fig. 3 zeigt die Aminosäuresequenz von Perlucin (modifiziert nach Mann et al., 2000) der SwissProt-Datenbank Nr. P82596 (SEQ ID NO:3). Sie besteht aus 155 Aminosäuren und enthält eine Glykosylierungsstelle am unterstrichenen Asparagin. Markiert sind die 12 unsicheren Posi-tionen und die 6 Cysteine.

[0039] Fig. 4 zeigt schematisch eine Kristallisator-Vorrichtung zur Herstellung von Biomineralien

[0040] Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Produktion von rekombinantem Perlucin

[0041] Anhand der unvollständigen Aminosäuresequenz des Perlucins (Mann et al., 2000) werden für die Synthese des Gens einzelsträngige, einander komplementäre und überlappende DNA-Teilsequenzen festgelegt, die je nach Bedarf etwa 30-120 Nukleotide lang sind und in den 12 unsicheren Positionen potentielle Funktionsvarianten und an den zukünftigen Gen-Enden solche Sequenzen enthalten, die für die Klonierung geeignet sind. Nach der Synthese von etwa 10-20 Oligonukleotiden (je nach Länge), werden diese nach an sich bekannten Verfahren zu einem DNA-Doppelstrang assoziiert, legiert und mittels PCR amplifiziert (siehe, z.B., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989)). Das Resultat ist ein Gemisch von sehr ähnlichen DNA-Doppelsträngen, die sich nur in Bezug auf diejenigen Nukleotide unterscheiden, die an den Positionen unsicherer Aminosäuren vorkommen. Dieses Gemisch wird mit Hilfe bekannter Verfahren in einen Expressionsvektor wie z.B. pET17b (Fa. Merck Biosciences) kloniert und zur Erzeugung einer entsprechenden Genbank in Wirtzellen, wie z.B. Escheriachi coli Stamm BL21 BE3 (Fa. Novagen) transformiert (siehe, z.B., Sambrook et al, 1989). Nach Selektion transformierter Klone werden diese auf die Expression Perlucin-artiger Proteine hin mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) gescreent, die betreffende Protein-Bande wird aus dem Gel ausgeschnitten und durch Elution mit Phosphat Puffer (50 mM NaH_2PO_4/Na_2HPO_4, pH 7) über Nacht in stark angereicherter Form gewonnen. Nach bekannten proteinchemischen Verfahren wird eine Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt, um Reste des Polyacrylamids abzutrennen, das Protein in wenigen Millilitern (ml) Phosphat Puffer aufgenommen, gegen das 1000-fache Volumen des gleichen Puffers bei 4°C zwei Stunden dialysiert und dann in Phosphat Puffer überführt, dem 20 mM an Dithiotreitrit (DTT) hinzugefügt wurde. In 3 jeweils 12-stündigen Dialysestufen wird das DTT zur Renaturierung des Proteins wieder schrittweise entfernt. Das so gewonnene rekombinante Perlucin ist in Phosphat Puffer bei 4°C monatelang haltbar und kann direkt für die Dialyse gegen $CaCl_2$ als erstem Schritt der Herstellung spezieller Kristallformen eingesetzt werden.

Beispiel 2: Herstellung von Perlucin-induzierten $CaCO_3$-Kristallformen

[0042] Einer vorzugsweise 5-50 mM $CaCl_2$-Lösung wird rekombinantes, gegen eine $CaCl_2$-Lösung der gleichen Konzentration dialysiertes Perlucin in einer Endkonzentration von ungefähr 0,001 bis 1 mg/ml, vorzugsweise von ca. 0,05 mg/ml zugesetzt und in einer Kristallisator-Vorrichtung bei geregelter Temperatur mit einer Atmosphäre in Kontakt gebracht, die einen genau einstellbaren CO_2-Gehalt aufweist, der zwischen 0,05 und 5 Vol.-%, vorzugsweise bei ca. 0,5% liegt. Die Perlucin-haltige, mit verdünnter Calciumhydroxid-Lösung auf etwa pH 7,5 eingestellte Lösung wird mit etwa 0,01 bis 1 % des vorgelegten Flüssigkeitsvolumens pro Minute mit Hilfe einer Pumpe kontinuierlich oder schubweise, je nach Perlucin-Konzentration auch in Intervallen mit stundenlangen Pausen ausgetauscht. Dabei kann im einfachen Fall stets neue Lösung verwendet werden, so dass keine pH-Titration erforderlich ist, oder die Perlucin-haltige $CaCl_2$-Lösung wird nach Passage der Kristallisationsfläche aufgefangen und in das Gefäß zurückgeführt, in dem die pH-Titration stattfindet und aus dem die Pumpe es erneut im Kreis fördert. Die Pum-

pe wird entweder über das Flüssigkeitsniveau, über vorgebene Zeitintervalle oder über anderweitige Parameter gesteuert. Wie in der Fig. 4 dargestellt, wird für die Kristallisation eine Vorrichtung verwendet, deren zentraler Teil eine von unten temperierte Platte aus Glas oder aus anderen Materialien mit sehr glatter Oberfläche ist. Sie befindet sich in einem Gehäuse, in das Kohlendioxidhaltige Luft eingeblasen und per Ventilator gleichmäßig verteilt wird. Die Kohlendioxidkonzentration wird in der Gehäuseluft mit Messfühlern kontinuierlich gemessen und steuert die Gas-Mischbatterie, so dass sein Gehalt und der Luftstrom stabil einstellbar sind. Je nach Größe der gewünschten Kristalle und je nach eingestellter Temperatur wird dieser Prozess zwischen 3 und 36 Stunden, bei besonderen Anforderungen aber auch wesentlich länger oder sogar kontinuierlich betrieben.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25. Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

Patentansprüche

1. Nukleinsäuremolekül, das für Perlucin kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
(a) einem Nukleinsäuremolekül, das für ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 2 kodiert;
(b) einem Nukleinsäuremolekül, das die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO:1 umfasst;
(c) einem Nukleinsäuremolekül, das ein Polypeptid mit einer Sequenz, die zumindest 60% identisch mit der Sequenz der SEQ ID NO:2 ist, kodiert;
(d) einem Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz, die sich von der Nukleotidsequenz eines der Nukleinsäuremoleküle von (a), (b) oder (c) durch die Degeneration des genetischen Codes unterscheidet;
(e) einem Nukleinsäuremolekül, das ein Fragment oder eine allelische Variation eines Nukleinsäuremoleküls von (a), (b), (c) oder (d) ist;

2. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, wobei die Base an Position 84 bezogen auf SEQ ID NO:3 nicht glykosyliertes Asparagin ist.

3. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 2, wobei die Base, bezogen auf SEQ ID NO:3, an Position 9 Histidin, an Positionen 11, 131 und 145 Arginin und an Position 133 Prolin ist.

4. Rekombinanter Vektor enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3.

5. Rekombinante Wirtszelle enthaltend den Vektor nach Anspruch 4.

6. Rekombinante Wirtszelle gemäß Anspruch 5, wobei die Zelle das Bakterium Escherichia coli ist.

7. Rekombinantes Polypeptid mit den biologischen Eigenschaften von Perlucin ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
(a) einem Polypeptid, das von der Nukleinsäure nach Anspruch 1 kodiert wird;
(b) einem Polypeptid, das die Aminosäuresequenz der SEQ ID NO:2 umfasst;
(c) einem Fragment oder Variante des Polypeptids von (a) oder (b) das von einer Nukleotidsequenz kodiert wird, die mit einer Nukleinsäure nach Anspruch 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

8. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Polypeptids mit den biologischen Eigenschaften von Perlucin umfassend:
(a) Kultivierung einer rekombinanten Wirtszelle nach den Ansprüchen 5 oder 6 unter Bedingungen, die zu einer Expression des rekombinanten Polypeptids führen;
(b) Gewinnung des Polypeptids.

9. Verwendung des rekombinanten Polypeptids nach Anspruch 7 zur Herstellung von Biomineralien.

10. Verfahren zur Herstellung von Biomineralien umfassend:
(a) Zugeben eines rekombinanten Polypeptids nach Anspruch 7 zu einer $CaCl_2$-Lösung;
(b) In-Kontakt-Bringen der Polypeptid-haltigen $CaCl_2$-Lösung von (a) mit einer Atmosphäre, die einen vorbestimmten CO_2-Gehalt aufweist, bei geregelter Temperatur, wobei eine Kristallbildung induziert wird;
(c) Ernten der gebildeten Kristalle.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei in Schritt (b) die Polypeptid-haltige $CaCl_2$-Lösung kontinuierlich oder diskontinuierlich zugeführt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei in Schritt (b) die Atmosphäre einen CO_2-Gehalt von etwa 0,05 bis etwa 5 Vol.-% CO_2, vorzugsweise etwa 0,5 Vol.-% CO_2, hat.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei in Schritt (a) etwa 0,001 bis etwa 1 mg/ml, vorzugsweise etwa 0,05 mg/ml, Polypeptid zugegeben werden.

14. Vorrichtung zur Herstellung von Biomineralien umfassend:
– ein gasdichtes Gefäß (**1**), in dem eine definierte CO_2-Atmosphäre einstellbar ist;
– eine, bevorzugt geneigte, temperierbare Platte (**2**) als Kristallisationsoberfläche im Gefäß (**1**);
– eine Zuleitung (**10**) für eine das Polypeptid nach Anspruch 7 enthaltende $CaCl_2$-Lösung in das Gefäß (**1**)

zur Verteilung dieser Lösung über die Platte (**2**); und
– eine Ableitung (**11**) für die überschüssige Lösung aus dem Gefäß (**1**).

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

```
TTTGTTTaacTTTaAGAAGGAGATATACATATGGGTTGTCCGCTGGGCTTTCATCAGCATC(
TCGCAGCTGCTATTGGTTCAGCACCATCAAAAGCAGCTTTGCGGAAGCGGCGGGTTATTGC(
GTTATCTGGAAAGCCATCTGGCGATCATCAGCAaCAAAGATGAAGATAGCTTCATTCGCGG
TATGCGACCCGTCTGGGCGAAGCGTTTAACTATTGGCTGGGCGCGAGCGATCTGAATATTG
AGGCCGTTGGCTGTGGGAAGGTCAGCGTCGTATGAACTATACCAACTGGAGCCCGGGTCAG(
CgGATAATGCGGGCGGTATTGAACATTGTCTGGAACTGCGTCGCGAtCTGGGTAACTATCT(
TGGaACGAtTATcAgTGCCAGAAACCGAgCcATTTcATCTGCGAAAAAGaACgCATCTCGT
TaCCAATAgCcTGcATGCGAATcTGCAgCAaCgTGATtcTcTGcACgCCAACcTGcAaCAg(
GCTAAGgATCC
```

Fig. 1

```
GCPLGFHQHR RSCYWFSTIK SSFAEAAGYC RYLESHLAII
SNKDEDSFIR GYATRLGEAF NYWLGASDLN IEGRWLWEGQ
RRMNYTNWSP GQPDNAGGIE HCLELRRDLG NYLWNDYQCQ
KPSHFICEKE RISYTNSLHA NLQQRDSLHA
NLQQR
```

Fig. 2

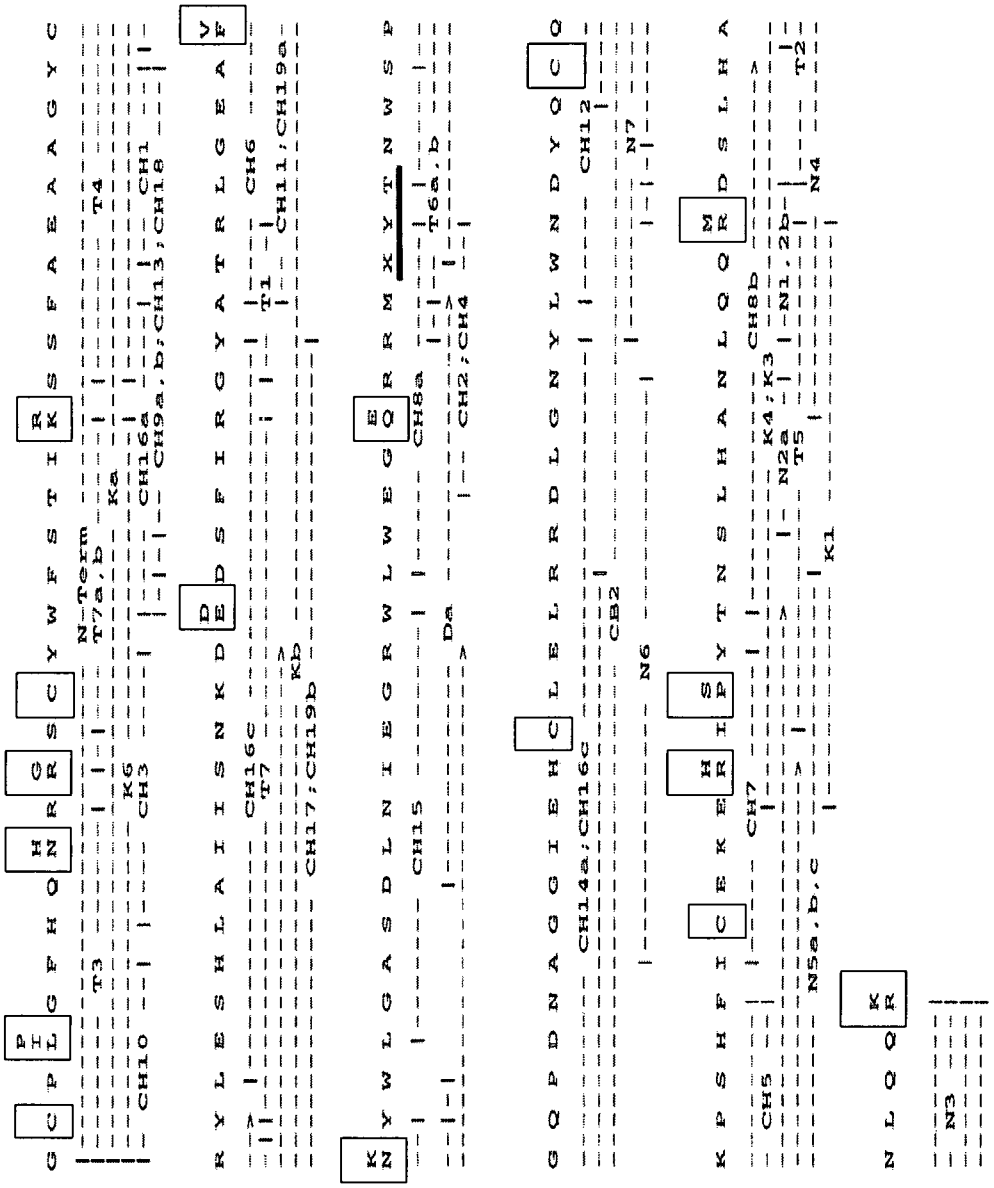


Fig.3

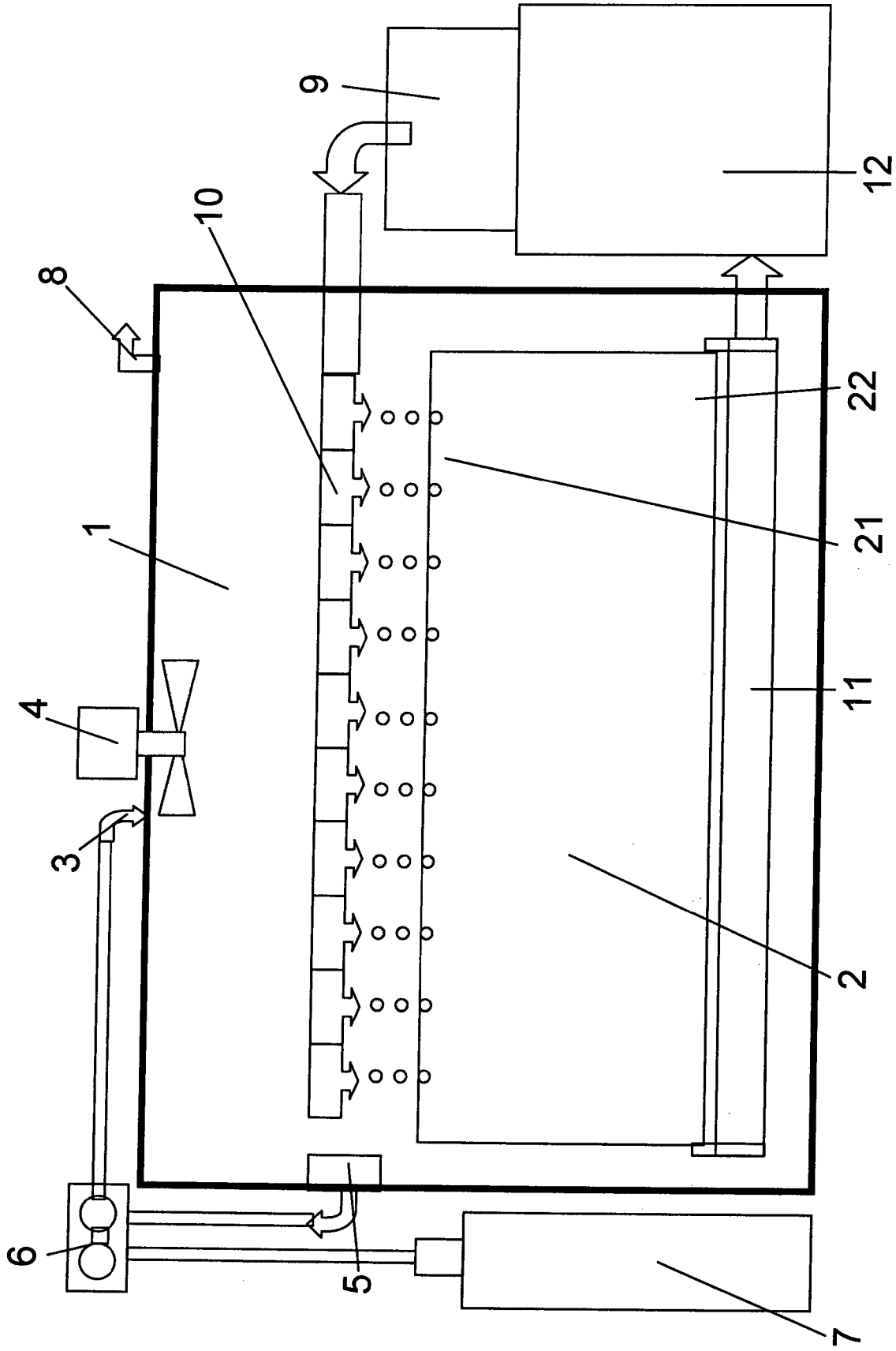


Fig. 4