



(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 10 2007 024 085 A1 2008.11.27

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 10 2007 024 085.8

(22) Anmeldetag: 22.05.2007

(43) Offenlegungstag: 27.11.2008

(51) Int Cl.⁸: C12N 15/55 (2006.01)

C12N 9/78 (2006.01)

(71) Anmelder:

Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 48149
Münster, DE

(74) Vertreter:

Michalski Hüttermann & Partner Patentanwälte,
40221 Düsseldorf

(72) Erfinder:

Moerschbacher, Bruno, 48161 Münster, DE;
Schaaf, Andreas, 48145 Münster, DE; Kinga
Jaszczuk, Beate, 48167 Münster, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu
ziehende Druckschriften:

EP 06 73 425 B1

WO 06/1 24 779 A2

Genbankeintrag: ES321999,(16.April 2007),Ps68
Wheat stripe rust fungus cDNA library Puccinia
striiformis f.sp.tritici cDNA;;

Genbankeintrag: EG374343,(21.Oktober
2006),Puccinia striiformis f.sp. tritici cDNA;;

Genbankeintrag: EG374469,(21.Oktober
2006),Puccinia striiformis f.sp. Tritici cDNA;;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: Nucleinsäuremoleküle codierend für ein Protein mit Deacetylase-Aktivität, besagtes Protein, sowie Verfahren zur Herstellung von Chitosan

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus:

a) Nucleinsäuremoleküle, die für eine Form des Polypeptids mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No: 3 codieren, wobei besagtes Polypeptid eine Deacetylase-Aktivität aufweist;

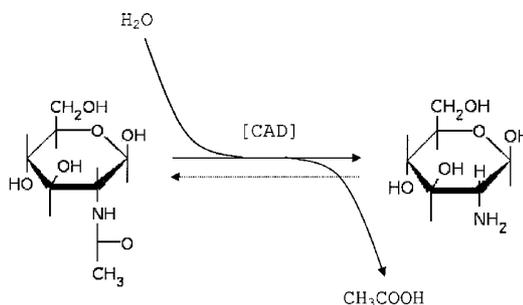
b) Nucleinsäuremoleküle, die die Nucleotidsequenz gemäß SEQ ID No: 1 oder SEQ ID No: 2 aufweisen und die für eine Form des besagten Polypeptids codieren;

c) Nucleinsäuremoleküle, die für ein Fragment oder ein Derivat eines Polypeptids, das durch ein Nucleinsäuremolekül gemäß a) oder b) codiert wird, codieren, wobei in besagtem Derivat ein oder mehrere Aminosäurereste im Vergleich zu besagtem Polypeptid konservativ substituiert sind und wobei besagtes Fragment oder Derivat eine Deacetylase-Aktivität hat;

d) Nucleinsäuremoleküle, die eine mindestens 95%ige Sequenzidentität mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß a)-c) aufweisen und die für ein Polypeptid mit Deacetylase-Aktivität codieren;

e) Nucleinsäuremoleküle, die eine mindestens 70%ige Sequenzidentität mit einem Nucleinsäuremolekül gemäß a)-c) aufweisen und die für ein Polypeptid mit Deacetylase-Aktivität codieren;

f) oder der komplementäre Strang eines Nucleinsäuremoleküls gemäß a)-e) (Fig. 4B).



B

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1 codierend für ein Protein mit Deacetylase-Aktivität, besagtes Protein sowie Verfahren zur Herstellung derselben.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Besagtes Protein mit Deacetylase-Aktivität ist insbesondere interessant für die Herstellung von Chitosan, das aufgrund seiner besonderen Eigenschaften in jüngerer Zeit erhöhte Aufmerksamkeit gefunden hat.

[0003] Bei Chitosan handelt es sich um den Oberbegriff für lineare Copolymere aus β -1,4-glycosidisch verknüpften N-Acetyl-Glucosamin-(GlcNAc) und Glucosamin-Resten(GlcN).

[0004] Im Prinzip handelt es sich dabei um partiell deacetyliertes Chitin (Poly-GlcNAc); es gibt aus diesem Grund keinen genau definierten Übergang zwischen Chitin und Chitosan. In der Regel spricht man ab einem Deacetylierungsgrad (d. h. ab einem GlcN-Anteil) von mehr als 40% von Chitosan. Aufgrund der Deacetylierung ist Chitosan im Unterschied zu Chitin in organischen Säuren löslich.

[0005] Man unterscheidet weiterhin zwischen niedermolekularen (M ~ 150 000 D), mittelmolekularen (M ~ 400 000 D) und hochmolekularen (M ~ 600 000 D) Chitosanen.

[0006] Chitosan ist eines der wenigen Biopolymere, das unter physiologischen Bedingungen eine positive Nettoladung trägt. Aufgrund dieser Tatsache interagiert Chitosan mit anionischen Substanzen wie Proteinen, DNA, Fettsäuren, und Phospholipiden. Diese physiko-chemischen Interaktionen werden für die verschiedenen biologischen Wirkungen von Chitosan verantwortlich gemacht.

[0007] Chitosan kommt in der Natur nur sehr selten vor; es findet sich hauptsächlich in der Zellwand von Pilzen der Klasse der Zygomycetes.

[0008] Chitosan für kommerzielle Zwecke wird daher aus Chitin hergestellt. Chitin ist ein weit verbreitetes Biopolymer und kommt insbesondere in den Zellwänden von Pilzen sowie im Exoskelett der meisten Arthropoden, insbesondere Crustaceen, vor. Vor allem die in der Aquakultur sowie dem Krabbenfang in großer Menge anfallenden Crustaceenschalen stellen eine kostengünstige Quelle für Chitin dar.

[0009] Im Stand der Technik wird Chitosan auf che-

mischem Weg aus Chitin hergestellt. Dazu werden die Crustaceenschalen zunächst vermahlen und anschließend zur Entfernung von Kalk, das einen Gewichtsanteil von 30% (w/w) an dem Schalenmaterial stellt, mit einem Überschuss von HCl (0.25–1%, 12–24 h, Raumtemperatur) behandelt. Anschließend wird gewaschen, und dann folgt ein Deproteinierungsschritt unter Verwendung eines Überschusses an heißer, wässriger NaOH (0.25–1 M, 1–3 h, 60–70°C). Das Produkt wird dann gewaschen, neutralisiert und getrocknet.

[0010] Das auf diese Weise gewonnene Chitin wird dann einer partiellen Deacetylierung unterzogen. Hierzu wird das Chitin wiederholt mit einer heißen konzentrierten Lauge, bevorzugt NaOH, behandelt (35–50%, 1–3 h, 90–130°C).

[0011] Es schließt sich in einigen Fällen ein Entfärbungsschritt, z. B. mit UV, O₃ oder H₂O₂, an. Das Produkt wird dann gewaschen, neutralisiert und getrocknet.

[0012] Das beschriebene Verfahren führt zu Produkten mit einem zufälligen Acetylierungsmuster, und überdies zu einer teilweisen Depolymerisierung des Polymers.

[0013] Überdies kann das Produkt unlösliche Bereiche mit sehr hohem Acetylierungsgrad aufweisen, die aus den inneren, kristallinen Bereichen der Chitin-Partikel herrühren.

[0014] Das so hergestellte Chitosan weist daher in Bezug auf Polymerisierungsgrad, Acetylierungsgrad und Acetylierungsmuster eine große Heterogenität auf. Gleichwohl ist dieses Produkt für eine Reihe von Anwendungen geeignet.

[0015] Anspruchsvollere Anwendungen erfordern jedoch Chitosane höherer Qualität, d. h. Chitosane mit genauer definiertem Polymerisierungsgrad, Acetylierungsgrad und Acetylierungsmuster.

[0016] Solche Chitosane lassen sich, wenn überhaupt, nur unter großem Aufwand aus den wie oben beschriebenen Produkten herstellen bzw. aufreinigen.

[0017] Seit einiger Zeit wird daher der Ansatz verfolgt, Chitosan mit Hilfe geeigneter Chitin-Deacetylasen aus Chitin herzustellen. Es wird vermutet, dass insbesondere marine Mikroorganismen Chitin-Deacetylasen aufweisen, um z. B. Exoskelette von Crustaceen-Kadavern abzubauen zu können.

[0018] Tanaka et al. (J Biol Chem. 2004; 279: 30021-7) haben eine Diacetylchitobiose-Deacetylase aus dem hyperthermophilen Archaeobacterium Thermococcus kodakaraensi beschrieben. Die rekombi-

nante Deacetylase zeigte Deacetylase-Aktivität gegenüber N-Acetylchitooligosacchariden; die deacetylierende Domäne weist eine Spezifität für den nicht-reduzierenden GlcNAc-Rest auf. Das Enzym wies ebenfalls eine Deacetylase-Aktivität gegenüber GlcNAc-Monomeren auf. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde der LmbE-Proteinfamilie zugeordnet, in welche auch N-Acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol-De-N-acetylasen und 1-D-myo-inosityl-2-acetamido-2-deoxy-alpha-D-glucopyranoside-Deacetylasen eingeordnet werden.

[0019] Es stellte sich heraus, dass sich die Thermococcus-Deacetylase nicht für die wirtschaftlich sinnvolle Produktion von Chitosan aus Chitin eignet. Es lässt sich allenfalls für die Produktion weniger, spezifischer Oligomere verwenden.

[0020] Hinzu kommt, dass die Expressionsrate dieses Proteins verhältnismäßig schlecht ist, so dass das gesuchte Protein nur in geringen Mengen hergestellt werden kann. Überdies weist das Protein sein Aktivitätsmaximum bei 75°C und pH 8.5 auf. Diese Bedingungen sind für viele Anwendungen nicht geeignet. Hinzu kommt, dass besagtes Protein nur die erste GlcNAc-Position am nichtreduzierenden Ende deacetyliert und maximal ein Pentamer als Substrat akzeptiert, beim Hexamer oder gar hochpolymeren Chitosanen jedoch keine Deacetylase-Aktivität mehr auftritt.

[0021] In der Summe ist die einzig denkbare kommerzielle Anwendung daher die Deacetylierung der ersten, nichtreduzierenden Position von Oligomeren mit einer Maximallänge von 5 Einheiten.

[0022] Blair et al. (Biochemistry, 2006, 45 (31), 9416–9426) haben erstmals die Struktur und den Wirkmechanismus einer Chitin-Deacetylase des pathogenen Pilzes *Colletotrichum lindemuthianum* (Erreger der Brennfleckenkrankheit) aufgezeigt.

[0023] Auch diese Deacetylase weist eine Reihe von Nachteilen auf, die sie für die industrielle Eignung nicht oder zumindest kaum geeignet machen. So kann diese Deacetylase nur maximal jede zweite Zuckerposition deacetylieren. Daher liegt der theoretisch erreichbare maximale Deacetylierungsgrad bei 50%. Hinzu kommt, dass mit dieser Deacetylase eine blockweise Deacetylierung nicht möglich ist.

Beschreibung der Erfindung

[0024] Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Deacetylase-Enzym mit Deacetylase-Aktivität gegenüber GlcNAc-Molekülen und -Polymeren (Chitin, Chitosanen) bereitzustellen, das sich in großen Mengen kostengünstig herstellen lässt und Aktivitätsbedingungen aufweist, die es besser für industrielle Prozesse geeignet machen.

[0025] Eine andere Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt darin, ein Verfahren zur Herstellung von Chitosan aus Chitin bereitzustellen, das wirtschaftlicher und umweltfreundlicher ist als das eingangs beschriebene Verfahren und/oder die Herstellung von genauer definierten Chitosanen ermöglicht.

[0026] Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, die Aminosäuresequenz sowie die betreffende Nukleinsäuresequenz für besagtes Deacetylase-Enzym bereitzustellen.

[0027] Diese Aufgabe wird mit einem Nukleinsäuremolekül, einem Protein bzw. einem Verfahren gemäß den unabhängigen Ansprüchen gelöst. Die Unteransprüche geben bevorzugte Ausführungsformen an.

[0028] Demnach ist ein Nukleinsäuremolekül vorgesehen, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- a) Nukleinsäuremoleküle, die für eine Form des Polypeptids mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No: 3 codieren, wobei besagtes Polypeptid eine Deacetylase-Aktivität aufweist;
- b) Nukleinsäuremoleküle, die die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No: 1 oder SEQ ID No: 2 aufweisen, und die für eine Form des besagten Polypeptids codieren;
- c) Nukleinsäuremoleküle, die für ein Fragment oder ein Derivat eines Polypeptids, das durch ein Nukleinsäuremolekül gemäß a) oder b) codiert wird, codieren, wobei in besagtem Derivat ein oder mehrere Aminosäurereste im Vergleich zu besagtem Polypeptid konservativ substituiert sind, und wobei besagtes Fragment oder Derivat eine Deacetylase-Aktivität hat;
- d) Nukleinsäuremoleküle, die eine mindestens 95%ige Sequenzidentität mit einem Nukleinsäuremolekül gemäß a)–d) aufweisen, und die für ein Polypeptid mit Deacetylase-Aktivität codieren;
- e) Nukleinsäuremoleküle, die eine mindestens 70%ige Sequenzidentität mit einem Nukleinsäuremolekül gemäß a)–d) aufweisen, und die für ein Polypeptid mit Deacetylase-Aktivität codieren;
- f) oder der komplementäre Strang eines Nukleinsäuremoleküls gemäß a)–e).

[0029] Unter dem Begriff „Fragment“ soll im Folgenden ein Polypeptid verstanden werden, das mindestens eine Aminosäure weniger als das ursprünglich beanspruchte Polypeptid aufweist.

[0030] Unter dem Begriff „Derivat“ soll im Folgenden ein Polypeptid verstanden werden, das mindestens eine Aminosäuren-Substitution im Vergleich zu dem ursprünglich beanspruchten Polypeptid aufweist.

[0031] Grundsätzlich sind jedoch durch die obige Definition auch solche Nukleinsäuremoleküle erfasst,

die zwar eine von den beanspruchten Sequenzen SEQ ID No: 1 oder SEQ ID No: 2 abweichende Sequenz aufweisen, bei denen sich diese Sequenzunterscheide jedoch nicht in Sequenzabweichungen des codierten Polypeptids äußern, da es sich um sogenannte „stille Punktmutationen“ (Punktmutationen in der dritten Stelle eines Tripletts) handelt, die aufgrund der Degenerierung des Genetischen Codes nicht zu einem Aminosäureaustausch führen (sogenannte "wobble"-Mutationen).

[0032] Unter dem Begriff „konservativ substituiert“ soll im folgenden eine Substitution eines Nukleinsäuremoleküls, d. h. eine oder mehrere Basenaustauschmutationen, verstanden werden, die dazu führen, dass eine an einer Stelle ursprünglich vorhandene Aminosäure durch eine Aminosäure ersetzt wird, die die Eigenschaften des Polypeptids nicht oder nicht wesentlich verändert. In der Regel trifft dies für substituierende Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften zu.

[0033] So fasst man u. A. die Aminosäuren Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin, Methionin und Valin zu den aliphatischen Aminosäuren zusammen. Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin werden zu den aromatischen Aminosäuren gezählt, Serin, Threonin, Asparagin, Glutamin und Tyrosin zählen zu den polaren Aminosäuren, Lysin, Arginin und Histidin zählen zu den basischen Aminosäuren, Asparaginsäure (Aspartat) und Glutaminsäure (Glutamat) zählen zu den sauren Aminosäuren und Cystein und Tyrosin zu den Aminosäuren mit ionisierbaren Resten.

[0034] Bei dem codierten Polypeptid mit Deacetylase-Aktivität handelt es sich, wie die Erfinder überraschend gefunden haben, um eine Chitin-Deacetylase (CDA), und zwar um eine Chitin-Deacetylase aus Weizenschwarzrost (*Puccinia graminis*).

[0035] Hinweise auf die Existenz einer Chitin-Deacetylase ergaben sich aus Experimenten mit axenischen Kulturen des Pilzes, die weltweit einzig in den Laboren der Erfinder durchgeführt werden können. Hier konnte zum Einen nachgewiesen werden, dass *P. graminis* seine Zellwand ab dem Moment des Eindringens in die Pflanze von Chitin nach Chitosan modifiziert, zum Zweiten fanden sich in Zymogrammen mit Chitin-Substrat wenigstens zwei (Iso-)Formen Chitin-deacetylierender Enzyme. Den Erfindern gelang es daraufhin durch Durchmusterung einer Lambda-cDNA-Bank die Sequenz einer putativen Polysaccharid-Deacetylase zu isolieren. Die primäre Identifikation fußte auf der Erkennung des in der PFAM-Datenbank hinterlegten polysacch_deac_1-Musters. Mit der erlangten Information war es den Erfindern möglich, die korrespondierende genomische Sequenz aus dem *P. graminis*-Genom zu isolieren und hinsichtlich ihrer Intron-/Exon-Struktur zu analysieren.

[0036] Hinsichtlich der Peptidsequenz weist das Protein das bereits benannte Sequenzpattern einer typischen Polysaccharid-Deacetylase auf (PFAM: polysacch_deac_1). Dieses Pattern erstreckt sich nahezu über die volle Länge der Aminosäuresequenz, besteht aber nur aus wenigen konservierten Positionen und längeren, intervenierenden, variablen Bereichen. N-terminal trägt das Protein zusätzlich ein durch Signal_P eindeutig erkanntes Sekretionssignal, weshalb die Erfinder eine extrazelluläre Lokalisation des Proteins vermuteten.

[0037] Die Erfinder haben festgestellt, dass Pilze der Art *Puccinia graminis* (wissenschaftlich *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*; Abk.: „Pgt“) im Augenblick der Infektion den in die Wirtspflanze eindringenden Teil ihrer Zellwand partiell deacetylieren. Die Erfinder vermuten, dass die Pilze sich auf diese Weise tarnen, um eine antimykotische Abwehrreaktion der Pflanze zu unterdrücken.

[0038] Die Erfinder haben daraufhin diese Deacetylase vorliegend erstmals beschrieben, isoliert, ihre Wirkung nachgewiesen und ihre Eignung zur industriellen Herstellung von Chitosan erkannt und beschrieben.

[0039] Im Speziellen vermuten die Erfinder eine herausragende Eignung derartiger Enzyme zur Produktion von Chitosanen mit nicht zufälligen und nicht blockweisen Acetylierungsmustern. Solche Chitosanprodukte könnten unter Anderem in der Medizin und im Pflanzenschutz Anwendung finden, da Ihre biologische Aktivität stark von benannten speziellen Verteilungsmustern abhängt, die auf konventionell chemischem Wege nicht darstellbar sind.

[0040] Besonders bevorzugt ist dabei ein Nukleinsäuremolekül vorgesehen, das aus einer sekretorischen Signalsequenz sowie dem besagten Nukleinsäuremolekül codierend für die genannte Deacetylase besteht.

[0041] Die erwähnte Signalsequenz codiert für ein sekretorisches Signalpeptid. Ein solches Signalpeptid ist ein Bestandteil eines Proteins, der zusammen mit der Sequenz für das eigentliche Protein auf der cDNA codiert ist, und der Informationen darüber enthält, wie und wohin dieses Protein innerhalb der Zelle transportiert werden soll. Proteine, die z. B. für den Transport in das Endoplasmatische Retikulum (ER) und damit u. U. für die spätere Sekretion bestimmt sind, besitzen in ihrer Aminosäuresequenz ein Signal, das sie spezifisch zur ER-Membran zielleitet. Bei sekretorischen Proteinen besteht das Signal aus einer 15 bis 40 Aminosäuren langen N-terminal lokalisierten Aminosäuresequenz. Obwohl die Primärstruktur dieser Signalpeptide nicht konserviert ist, können drei verschiedene Bereiche unterschieden werden: ein zentraler hydrophober Kern wird N-termi-

nal von positiv geladenen Aminosäuren und C-terminal von polaren Aminosäuren flankiert. In den meisten Fällen wird das Signalpeptid nach dem Membrandurchtritt proteolytisch vom eigentlichen Protein durch das Enzym Signalpeptidase abgespalten. Die Schnittstelle wird dabei durch kleine Aminosäurereste in den Positionen -3 und -1 der C-terminalen polaren Region der Signalsequenz definiert.

[0042] Ein typisches eukaryontisches Signalpeptid, das den Transport des zu synthetisierenden Proteins ins ER bewerkstelligt, weist z. B. folgende Aminosäuresequenz auf:

MMSFVSLLVGIFWATEAEQLTKCEVFQ

[0043] Die für das Signalpeptid codierende Sequenz wird, da sie im Bereich des 5'-Endes der Nukleinsäuresequenz angeordnet ist, bei der Translation am Ribosom als erstes synthetisiert, so dass sich, wenn das Signalpeptid weit genug aus dem Ribosom herausragt, das SRP („Signal Recognition Particle“, ein mittelgroßes Riboprotein) an die naszierende Polypeptidkette und das Ribosom anlagert und die Translation stoppt. An der Oberfläche des (rauen) ER befindet sich ein SRP-Rezeptor, der das Ribosom bindet und in Position an das Translocon bringt. Das SRP wird daraufhin abgespalten und kann erneut zur Markierung dienen. Die Polypeptidkette wird nun durch das Translocon in das Lumen des ER weiter-synthetisiert. Anschließend entfernt das Enzym Signalpeptidase die Signalsequenz. Ist die Translation abgeschlossen, wird das Protein im ER-Lumen – ggf. mit Hilfe von Chaperonen – gefaltet. Hinzu kommt ggf. weitere Schritte, die unter dem oben bereits eingeführten Begriff der posttranslationalen Modifikation zusammengefasst werden.

[0044] In der Biotechnologie macht man sich solche Signalpeptide zunutze, um sicherzustellen, dass das herzustellende Protein in das die Zellen umgebende Medium sezerniert wird. Hierzu wird ein Expressionssystem verwendet, bei dem eine für das herzustellende Protein codierende cDNA in einen 3' gelegenen Bereich einer für ein Signalpeptid codierenden cDNA einkloniert wird. In der Regel geschieht das über eine downstream von der Signalsequenz gelegene Restriktionsschnittstelle. Da diese in der Regel mindestens zwei Nukleotidtripletts aufweist, erhält man auf diese Weise ein Konstrukt, bei welchem die Signalsequenz und die für das herzustellende Protein codierende Sequenz durch mindestens zwei Nukleotidtripletts getrennt ist; das translatierte Protein weist also mindestens zwei Aminosäurereste zwischen dem Signalpeptid und dem herzustellenden Protein auf. Demnach ist ein Nukleinsäuremolekül vorgesehen, das für ein Signalpeptid codiert, und das dadurch gekennzeichnet ist, dass das Nukleinsäuremolekül im Bereich seines 3'-Endes eine Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease aufweist.

[0045] Häufig weisen native Nukleinsäuremoleküle, die für Signalpeptide codieren, keine Restriktionsschnittstelle auf, zumindest nicht im Bereich ihrer 3'-Enden. Es ist daher bevorzugt vorgesehen, dass die Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease durch eine stille Punktmutation in der nativen Nukleotidsequenz des Nukleinsäuremoleküls für das Signalpeptid erzeugt ist. Auf diese Weise bleibt die Funktion des Signalpeptides erhalten, und es kommen die oben genannten Vorteile zum Tragen.

[0046] Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit Deacetylase-Aktivität vorgesehen, aufweisend die folgenden Schritte:

- a) ggf. Klonieren eines Nukleinsäuremoleküls gemäß obiger Definition in einen Expressionsvektor,
- b) Transfektion Nukleinsäuremoleküls bzw. des Expressionsvektors in ein Expressionssystem,
- c) Inkubation und/oder Fermentation des Expressionssystems;
- f) ggf. spezifische Induktion der Proteinexpression;
- g) Aufreinigung des exprimierten Proteins mit Deacetylase-Aktivität.

[0047] Bei dem exprimierten Protein handelt es sich um eine Chitin-Deacetylase aus Weizenschwarzrost (*Puccinia graminis*).

[0048] Unter dem Begriff „klonieren“ sollen im folgenden alle Techniken verstanden werden die es erlauben, ein Nukleinsäuremolekül gemäß obiger Definition in einen Expressionsvektor zu integrieren. Dem Fachmann sind hier eine Vielzahl von Techniken bekannt, deren wesentliche z. B. in dem Lehrbuch „Molekulare Biotechnologie“ von Michael Wink (1. Auflage, (September 2004, Wiley-VCH), oder in anderen dem Fachmann bekannten Lehrbüchern und Veröffentlichungen beschrieben sind.

[0049] Unter dem Begriff „Expressionsvektor“, der optional zu verwenden ist, sollen dem Fachmann an sich bekannte Transportmoleküle zur Übertragung eines Fremd-Nukleinsäuremoleküls in eine Empfängerzelle verstanden werden. Hierzu zählen insbesondere Plasmide, λ -Phagen, Cosmide, Phasmide, P1-Phage, BACs, PACs, und YACs. Weitere geeignete Vektoren sind z. B. in dem Lehrbuch „Molekulare Biotechnologie“ von Michael Wink (1. Auflage, (September 2004, Wiley-VCH), oder in anderen dem Fachmann bekannten Lehrbüchern und Veröffentlichungen beschrieben.

[0050] Bei dem optional verwendeten Expressionsvektor handelt es sich bevorzugt um das Plasmid pMel1, das insbesondere in *Schizosaccharomyces pombe* als bevorzugtem Expressionssystem zum Einsatz kommt. Dieses Plasmid ist in [Fig. 3](#) dargestellt.

[0051] Unter dem Begriff „Transfektion“ soll im folgenden das Einbringen eines Fremd-Nukleinsäuremoleküls in eine Empfängerzelle verstanden werden, insbesondere unter Zuhilfenahme eines Expressionsvektors.

[0052] Unter den Begriffen „Inkubation“ und/oder Fermentation des Expressionssystems soll im folgenden das Haltern des Expressionssystems unter Wachstums- und zellteilungsfördernden Bedingungen verstanden werden., Dem Fachmann sind diese Bedingungen (insbesondere pO_2 , pH, Temperatur, Medienzusammensetzung, etc.) aus der Fachliteratur bekannt.

[0053] Weiterhin ist bevorzugt vorgesehen, dass das exprimierte Protein mit Deacetylase-Aktivität durch Affinitätschromatographie, Gelfiltration und/oder Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt wird. Hier kommt insbesondere die Kombination mit einem His-Tag in Frage. Hierbei handelt es sich um ein aus mehreren Histidin-Resten bestehendes Tag, das an das aufzureinigende Protein angehängt ist. Die hierfür codierende DNA ist in der Regel Bestandteil des Expressionsvektors und wird zusammen mit der cDNA des zu exprimierenden Proteins translatiert.

[0054] Grundprinzip dieses Aufreinigungsverfahrens ist die sogenannte "IMAC" (Immobilized Metal Affinity Chromatography). Dabei werden zweifach positiv geladene Kationen wie Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} oder Zn^{2+} über einen chelierenden Liganden an eine Matrix immobilisiert, und interagieren mit den Seitengruppen der Histidin-reste des His-Tag. Weitere, erfindungsgemäß einsetzbare Affinitäts-Tags sind z. B. Maltose-bindendes Protein (MBP) oder Glutathionyl-S-Transferase (GST), aber auch das S-Tag, HAT-Tag, Calmodulin-Binde-Peptid, Chitin-Binde-Peptid und einige Cellulose-Binde-Domänen. Hier kommen ähnliche Aufreinigungsmechanismen zum Einsatz.

[0055] Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Expressionsvektor vorgesehen, der das oben beschriebene Nukleinsäuremolekül enthält. Ein solcher Expressionsvektor ist z. B. in [Fig. 2](#) gezeigt.

[0056] Ebenso ist erfindungsgemäß eine Wirtszelle, die mit einem solchen Nukleinsäuremolekül in einem solchen Expressionsvektor transformiert wurde, wobei diese Zelle als Expressionssystem fungiert. Bei einer solchen Wirtszelle kann es sich z. B. um eine eukaryontische Wirtszelle handeln. Bevorzugt werden hier Hefezellen verwendet, insbesondere Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und Spaltheife (*Schizosaccharomyces pombe*).

[0057] Geeignet sind zwar prinzipiell alle eukaryontischen Expressionssysteme (also Pilze inkl. Hefen,

Einzeller, Pflanzen, Insektenzellen und Säugerzellen). In der Regel können funktionelle Proteine jedoch nur in Kombination mit einem im entsprechenden System gut funktionierenden Sekretionssignal exprimiert und sezerniert werden. Es ist daher bevorzugt, den beschriebenen Vektor in anderen Hefen einzusetzen oder das Prinzip zu übertragen. Hierbei ist insbesondere an die folgenden Hefen gedacht: *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*.

[0058] Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Polypeptid bzw. Protein vorgesehen, das durch das oben beschriebene Nukleinsäuremolekül codiert ist oder mit dem oben beschriebenen Verfahren herstellbar ist, wobei dieses Polypeptid bzw. Protein eine Deacetylase-Aktivität aufweist. Bevorzugt weist dieses Polypeptid bzw. Protein eine Aminosäuresequenz auf, die in SEQ ID No 3 dargestellt ist.

[0059] Abweichend davon kann das Polypeptid bzw. Protein eine Aminosäuresequenz aufweisen, in welcher ein oder mehrere Aminosäurereste konservativ substituiert sind. In Bezug auf den Begriff "konservativ substituiert" wird auf die obigen Ausführungen verwiesen.

[0060] Bei diesem Polypeptid bzw. Protein handelt es sich um eine Chitin-Deacetylase aus Weizen-schwarzrost (*Puccinia graminis*).

[0061] Es ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von Chitosan aus Chitin vorgesehen, bei welchem N-Acetyl-Glucosaminreste (GlcNAc) in einem GlcNAc-Mono- oder -Oligomer, einem GlcNAc-Polymer, einem Copolymer aus GlcNAc und Glucosamin oder in einem Chitinmolekül mit einer solchen Chitin-Deacetylase deacetyliert werden.

[0062] Dabei wird bevorzugt ein pH-Wert zwischen 3 und 12 sowie eine Temperatur zwischen 5 und 80°C eingestellt. Als Puffer kommen insbesondere Tris, Bicine, Phosphat und Borat in Frage. Die Pufferkonzentration beträgt bevorzugt 10–100 mM, ganz besonders bevorzugt 40–60 mM. Bevorzugt werden außerdem Kofaktoren verwendet, so z. B. Zn (1 mM) Besonders bevorzugt liegt der pH-Wert im Bereich zwischen 6 und 11, und ganz besonders bevorzugt liegt der pH-Wert zwischen 8 und 10.

[0063] Die Erfinder haben, um die Verfahrensbedingungen experimentell zu optimieren, Chitohexamere mit einem Acetylierungsgrad von 100% (DP6/DA100) und 42% (DP6/DA42) 27 h lang bei 37°C und verschiedenen pH-Werten mit der erfindungsgemäßen Pgt-CDA verdaut. Die Reaktionsprodukte sowie Kontrollansätze ohne Enzym wurden mittels DC aufgetrennt und mittels Fluorescamin-Assay ausgewertet. Dabei wurde bei einem pH-Wert 9,0 die höchste Deacetylaseaktivität (von 100% auf 64% bzw. von

43% auf 33%) festgestellt, bei pH 6,0 (von 100% auf 84% bzw. von 43% auf 35%) bzw. bei pH 4,0 (von 100% auf 99% bzw. von 43% auf 39%) lag die Aktivität deutlich geringer.

[0064] Alternativ hierzu ist ein Verfahren zur Herstellung von Chitosan vorgesehen, in welchem N-Acetyl-Glucosamin-Monomere (GlcNAc) mit einer solchen Chitin-Deacetylase deacetyliert werden, um so Glucosamin-Monomere (GlcN) herzustellen, die dann z. B. in einem weiteren Teilschritt mit unbehandelten GlcNAc-Monomeren copolymerisiert werden, um Chitosan zu erhalten.

[0065] Ebenso kann jedoch vorgesehen sein, dass die erfindungsgemäße Chitin-Deacetylase zur Acetylierung von Glucosaminresten (GlcN) in einem GlcN-Mono- oder Oligomer, einem GlcN-Polymer, einem Copolymer aus GlcNAc und Glucosamin oder einem Chitosanmolekül verwendet wird.

[0066] Durch die Wahl geeigneter (d. h. im Prinzip ungünstiger) Reaktionsbedingungen (temperatur, pH, Umkehrung des Reaktionsgleichgewichts durch Abfuhr der acetylierten Substrate und Zufuhr deacetylierter Substrate) kann die CDA zu einer Umkehr ihrer Reaktionsrichtung gebracht werden, so wie es in praktisch allen enzymatisch katalysierten Reaktionen der Fall ist. Tut man dies, kann man die CDA zur Reacetylierung insbesondere von Chitosansubstraten nutzen. Die dabei entstehenden Produkte werden im Folgenden „acetylierte Produkte“ genannt; es kann sich hier selbstverständlich auch um Chitosane mit unterschiedlichen Acetylierungsmustern und –anteilen handeln, aber insbesondere auch um Chitin. Diese Anwendung ist von hohem allgemeinem Interesse, da sie wiederum zu Produkten mit definiertem Acetylierungsmuster und Acetylierungsanteil definiertem führen kann.

[0067] Weiterhin ist erfindungsgemäß ein Chitosan oder ein wie gerade beschrieben acetyliertes Produkt vorgesehen, das mit einem der genannten Verfahren herstellbar ist. Ein solches Chitosan oder acetyliertes Produkt zeichnet sich durch einen genau definierbaren Polymerisations- und Acetylierungsgrad sowie ein genau definierbares Acetylierungsmuster aus.

[0068] Schließlich ist erfindungsgemäß die Verwendung eines solchen Chitosans oder acetylierten Produkts für mindestens einen der Zwecke vorgesehen, ausgewählt aus der Gruppe enthaltend:

- a) Immobilisierung von Enzymen und Zellen in biotechnologischen Verfahren;
- b) Verstärkung und/oder Färbung von menschlichen und/oder tierischem Haar;
- c) Haut- und/oder Haarpflege;
- d) Schutz und Konservierung von Saatgut und/oder Getreide;
- e) Adsorption von Endotoxinen und Nukleinsäu-

ren
f) Papierverarbeitung.

[0069] Weitere, erfindungsgemäß vorgesehene Verwendungen umfassen:

- a) Polymer-Träger für Katalysatoren;
- b) Zwischenprodukt für die Synthese von Feinchemikalien;
- c) Zusatz für Molkefütter;
- d) Kompostierungsbeschleuniger;
- e) Verpackungsmaterial;
- f) Klärungsmittel für Säfte;
- g) Flockenbildungsmittel;
- h) diätetische Faser für Nahrungsmittel;
- i) Beschichtungsmittel für Nahrungsmittel;
- j) Wundauflage;
- k) chirurgisches Nahtmaterial;
- l) diätetischer Nahrungszusatz;
- m) Kontaktlinsen;
- n) Lautsprechermembrane;
- o) Einbettungsmittel für die Elektronenmikroskopie;
- p) oder Fällungsmittel für die Trink- und Abwasserreinigung.
- q) Matrizes für das Tissue Engineering
- r) Chitosan-Partikel für Drug-, Gene- und Vaccine-Delivery

[0070] Viele dieser Verwendungen profitieren von dem genau definierbaren Acetylierungsgrad sowie dem genau definierbaren Acetylierungsmuster der erfindungsgemäß herstellbaren Chitosane, der sich insbesondere in einer definierten Löslichkeit sowie in einer definierten Nettoladung des betreffenden Polymers äußert. Beide Parameter sind entscheidend für die genannten Verwendungszwecke.

Abbildungen und Beispiele

[0071] Die vorliegende Erfindung wird durch die im Folgenden gezeigten und diskutierten Figuren und Beispiele genauer erläutert. Dabei ist zu beachten, dass die Figuren nur beschreibenden Charakter haben und nicht dazu gedacht sind, die Erfindung in irgendeiner Form einzuschränken.

[0072] Fig. 1 zeigt ein Screening des Kulturmediums, in welchem mit einem Konstrukt (pMel-CDA) transformierte *Schizosaccharomyces pombe*-Zellen kultiviert wurden. Die Zellen wurden in 10 ml-Kulturen (Falcontubes) kultiviert. Das Kulturmedium wurde 20 h nach Induktion untersucht. Die Aufreinigung der erfindungsgemäßen Pgt-CDA aus dem Kulturmedium erfolgte mittels NiNTA-IMAC-Affinitätschromatographie.

[0073] Dabei zeigt Fig. 1a) die mit Silber gefärbten PAGE-Gele der wichtigsten Aufreinigungsschritte, Fig. 1b) ein Silbergel der Haupt-Elutionsfraktionen, und Fig. 1c) einen Western-blot der Haupt-Elutions-

fraktion (anti-His-tag). Die Gelbahnen sind wie folgt beschickt:

R: Rohfraktion (konz. Kulturmedium)
 FT: Durchflussfraktion
 W: Waschfraktion
 E8-E12: Elutionsfraktionen

[0074] Die Gesamtvolumina der Fraktionen betragen:
 R: 100 ml
 FT: 100 ml
 W: 50 ml
 E8-12: 1 ml

[0075] Die Bahnen wurden jeweils mit 15 µl Probe beschickt.

[0076] Fig. 2 zeigt die Ergebnisse von Aktivitätstest rekombinanter Pgt-CDA gegenüber Chitosan-Substraten. Dabei zeigt **Fig. 2a**) ein Zymogramm (Substrat: Glykol-Chitin, Inkubation: 37°C in 50 mM BisTris, pH6 über Nacht, Negativfärbung mit Calcofluor nach Depolymerisation von Chitosan mit salpetriger Säure).

[0077] **Fig. 2b)** zeigt die Ergebnisse einer Dünnschichtchromatographie (DC). Dabei wurden Chitohexamere mit einem Acetylierungsgrad von 100% (DP6/DA100) und 42% (DP6/DA42) 27 h lang bei 37°C unter zwei verschiedenen Pufferbedingungen (50 mM BisTris, pH 6,0 und 50 mM Borat, pH 9,0) mit rekombinanter Pgt-CDA verdaut. Die Reaktionsprodukte sowie Kontrollansätze ohne Enzym wurden mittels DC aufgetrennt und anschließend visualisiert.

[0078] Die Markierung „---“ entspricht einem Ansatz ohne Enzym, die Markierung „CDA“ entspricht einem Ansatz mit Enzym.

[0079] Fig. 3 zeigt die Strukturformel eines Ausschnitts aus einem Copolymer aus N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc; links) und Glucosamin (GlcN; rechts), die β-1,4-glycosidisch miteinander verknüpft sind. Dieser Ausschnitt steht idealtypisch für die Struktur von Chitosan.

[0080] Fig. 4 zeigt das Reaktionsschema der Deacetylierung von N-Acetyl-Glucosamin auf chemischem Wege (**Fig. 4A**) bzw. mit Hilfe der erfindungsgemäßen Chitin-Deacetylase (**Fig. 4B**). Analog gelten die Reaktionsschemata auch für die Deacetylierung von N-Acetyl-Glucosaminresten in einem Chitin- bzw. Chitosanmolekül.

[0081] Die Verwendung einer erfindungsgemäßen Chitin-Deacetylase ermöglicht gegenüber der klassischen chemischen Deacetylierung die Herstellung von besser definierten und reproduzierbaren Chito-

sanen.

[0082] Die ebenfalls beschriebene Verwendung der erfindungsgemäßen CDA zur Reacetylierung ist in Fig. 4 durch den unterbrochen dargestellten Reaktionspfeil angegeben.

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

ZITATE ENHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Tanaka et al. (J Biol Chem. 2004; 279: 30021-7) **[0018]**
- Blair et al. (Biochemistry, 2006, 45 (31), 9416–9426) **[0022]**
- „Molekulare Biotechnologie“ von Michael Wink (1. Auflage, (September 2004, Wiley-VCH) **[0048]**
- „Molekulare Biotechnologie“ von Michael Wink (1. Auflage, (September 2004, Wiley-VCH) **[0049]**

Patentansprüche

1. Nukleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) Nukleinsäuremoleküle, die für eine Form des Polypeptids mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No: 3 codieren, wobei besagtes Polypeptid eine Deacetylase-Aktivität aufweist;
- b) Nukleinsäuremoleküle, die die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No: 1 oder SEQ ID No: 2 aufweisen, und die für eine Form des besagten Polypeptids codieren;
- c) Nukleinsäuremoleküle, die für ein Fragment oder ein Derivat eines Polypeptids, das durch ein Nukleinsäuremolekül gemäß a) oder b) codiert wird, codieren, wobei in besagtem Derivat ein oder mehrere Aminosäurereste im Vergleich zu besagtem Polypeptid konservativ substituiert sind, und wobei besagtes Fragment oder Derivat eine Deacetylase-Aktivität hat;
- d) Nukleinsäuremoleküle, die eine mindestens 95%ige Sequenzidentität mit einem Nukleinsäuremolekül gemäß a)–c) aufweisen, und die für ein Polypeptid mit Deacetylase-Aktivität codieren;
- e) Nukleinsäuremoleküle, die eine mindestens 70%ige Sequenzidentität mit einem Nukleinsäuremolekül gemäß a)–c) aufweisen, und die für ein Polypeptid mit Deacetylase-Aktivität codieren;
- f) oder der komplementäre Strang eines Nukleinsäuremoleküls gemäß a)–e).

2. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, wobei es sich bei dem codierten Polypeptid mit Deacetylase-Aktivität um eine Chitin-Deacetylase (CDA) handelt.

3. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 2, wobei es sich bei dem codierten Polypeptid um eine Chitin-Deacetylase aus Weizenschwarzrost (*Puccinia graminis*) handelt.

4. Nukleinsäuremolekül, dadurch gekennzeichnet, dass dieses aus einer sekretorischen Signalsequenz sowie einem Nukleinsäuremolekül gemäß einem der vorherigen Ansprüche besteht.

5. Verfahren zur Herstellung eines Proteins mit Deacetylase-Aktivität, aufweisend die folgenden Schritte:

- a) ggf. Klonieren eines Nukleinsäuremoleküls gemäß obiger Definition in einen Expressionsvektor,
- b) Transfektion Nukleinsäuremoleküls bzw. des Expressionsvektors in ein Expressionssystem,
- c) Inkubation und/oder Fermentation des Expressionssystems;
- f) ggf. spezifische Induktion der Proteinexpression;
- g) Aufreinigung des exprimierten Proteins mit Deacetylase-Aktivität.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei es sich

bei dem exprimierten Protein um eine Chitin-Deacetylase aus Weizenschwarzrost (*Puccinia graminis*) handelt.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5–6, wobei es sich bei dem Expressionsvektor um das Plasmid pMel1 handelt.

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5–7, wobei es sich bei dem Expressionssystem um *Schizosaccharomyces pombe* handelt.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5–8, wobei das exprimierte Protein mit Deacetylase-Aktivität durch Affinitätschromatographie und/oder Gelfiltration aufgereinigt wird.

10. Expressionsvektor, enthaltend das Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1–4.

11. Wirtszelle, die mit einem Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1–4 oder mit dem Expressionsvektor gemäß Anspruch 10 transformiert wurde, wobei diese Zelle als Expressionssystem fungiert.

12. Polypeptid bzw. Protein, dass durch das Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 bis 4 codiert ist, eine Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 1 aufweist oder mit dem Verfahren gemäß Anspruch 5–8 herstellbar ist, wobei dieses Protein eine Deacetylase-Aktivität aufweist.

13. Polypeptid bzw. Protein gemäß Anspruch 12, wobei es sich bei diesem Protein um eine Chitin-Deacetylase aus Weizenschwarzrost (*Puccinia graminis*) handelt.

14. Verfahren zur Herstellung von Chitosan aus Chitin, bei welchem N-Acetyl-Glucosaminreste (GlcNAc) in einem GlcNAc-Mono- oder -Oligomer, einem GlcNAc-Polymer, einem Copolymer aus GlcNAc und Glucosamin oder in einem Chitinmolekül mit einem Protein gemäß Anspruch 12–13 deacetyliert werden.

15. Verfahren zur Herstellung von Chitosan, in welchem N-Acetyl-Glucosamin-Monomere (GlcNAc) mit einem Protein gemäß Anspruch 12–13 deacetyliert werden, um so Glucosamin-Monomere (GlcN) herzustellen, die dann z. B. mit unbehandelten GlcNAc-Monomeren copolymerisiert werden, um Chitosan zu erhalten.

16. Verfahren zur Acetylierung von Glucosaminresten (GlcN) in einem GlcN-Mono- oder Oligomer, einem GlcN-Polymer, einem Copolymer aus GlcNAc und Glucosamin oder einem Chitosanmolekül dadurch gekennzeichnet, dass dabei ein Protein gemäß Anspruch 12–13 verwendet wird.

17. Chitosan bzw. acetyliertes Produkt, das mit einem der Verfahren gemäß einem der Ansprüche 14–16 herstellbar ist.

18. Verwendung eines Chitosans bzw. eines acetylierten Produkts gemäß Anspruch 17 für mindestens einen der Zwecke ausgewählt aus der Gruppe enthaltend:

- a) Immobilisierung von Enzymen und Zellen in biotechnologischen Verfahren;
- b) Verstärkung und/oder Färbung von menschlichen und/oder tierischem Haar;
- c) Haut- und/oder Haarpflege;
- d) Schutz und Konservierung von Saatgut und/oder Getreide;
- e) Adsorption von Endotoxinen und Nukleinsäuren
- f) Papierverarbeitung.

19. Verwendung eines Chitosans bzw. eines acetylierten Produkts gemäß Anspruch 17 für mindestens einen der Zwecke ausgewählt aus der Gruppe enthaltend:

- a) Polymer-Träger für Katalysatoren;
- b) Zwischenprodukt für die Synthese von Feinchemikalien;
- c) Zusatz für Molkefutter;
- d) Komostierungsbeschleuniger;
- e) Verpackungsmaterial;
- f) Klärungsmittel für Säfte;
- g) Flockenbildungsmittel;
- h) diätetische Faser für Nahrungsmittel;
- i) Beschichtungsmittel für Nahrungsmittel;
- j) Wundauflage;
- k) chirurgisches Nahtmaterial;
- l) diätetischer Nahrungszusatz;
- m) Kontaktlinsen;
- n) Lautsprechermembrane;
- o) Einbettungsmittel für die Elektronenmikroskopie; oder
- p) Fällungsmittel für die Trink- und Abwasserreinigung.
- q) Matrizes für das tissue engeneering
- r) Chitosan-Nanopartikel für drug-, gene- und vaccinedelivery

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

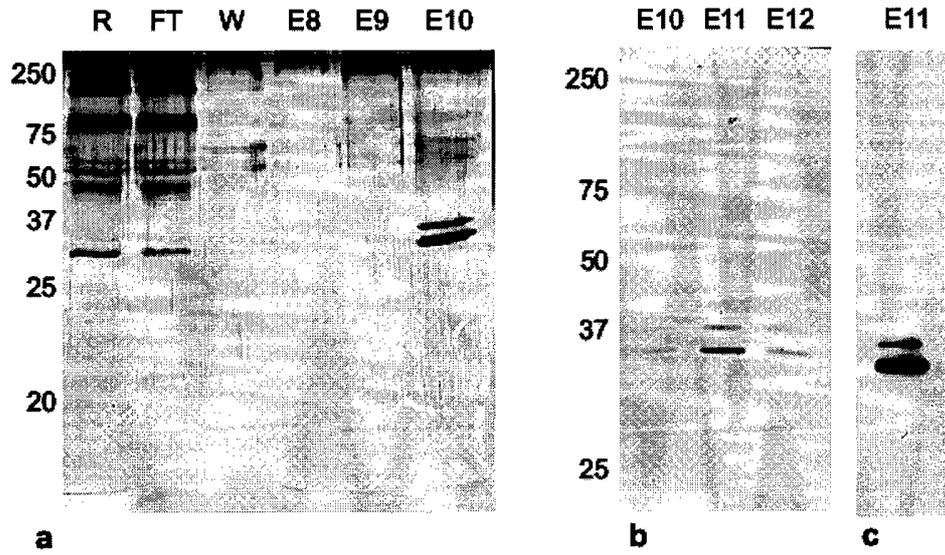


Fig. 1

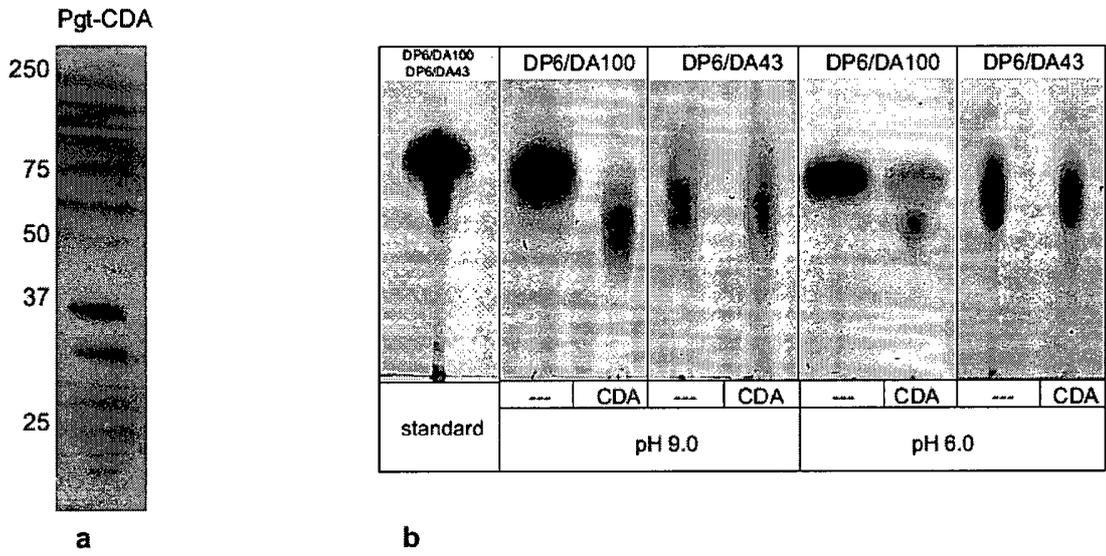
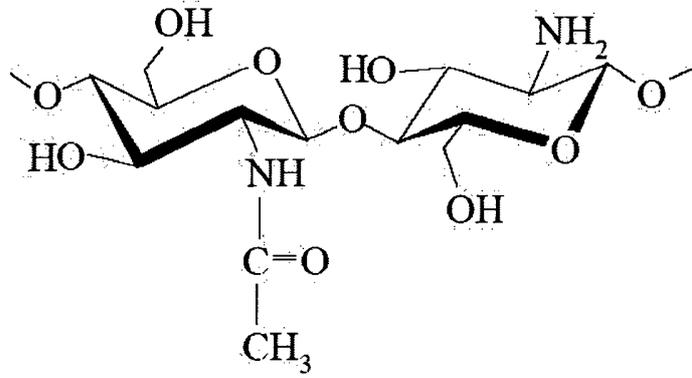


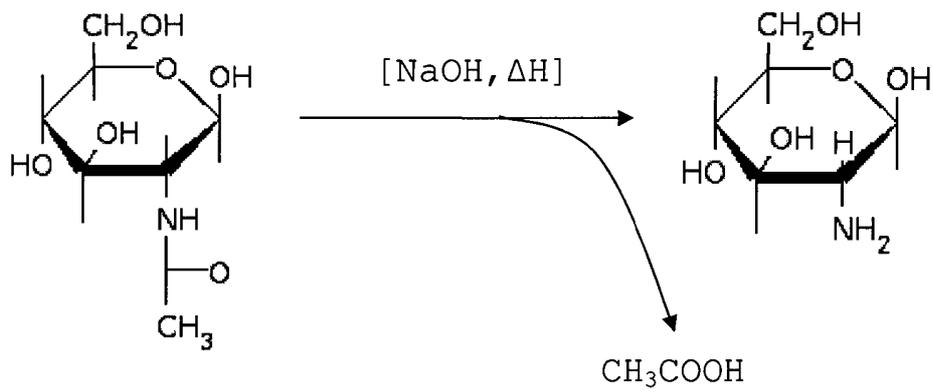
Fig. 2



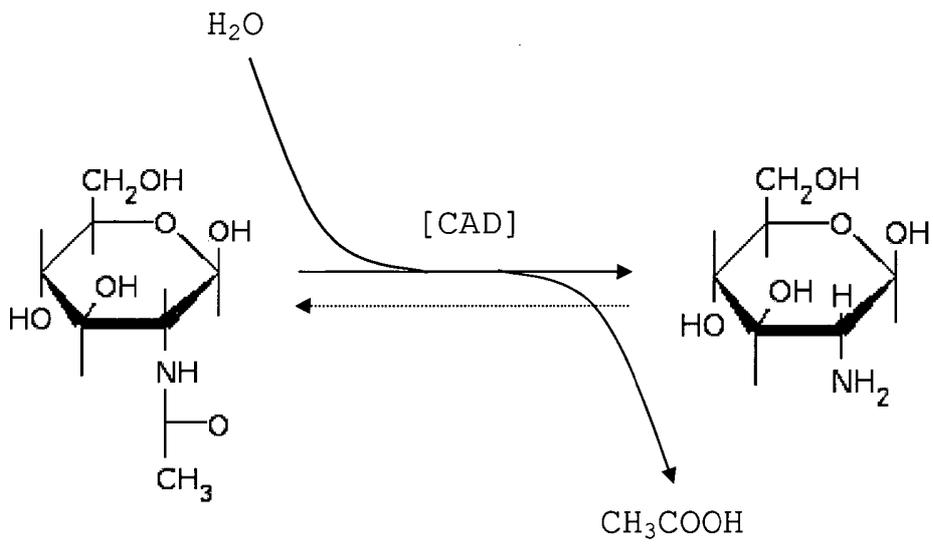
H₂O

Fig.

3



A



B

Fig. 4