



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 19 077 T2 2007.07.12**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 470 221 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 19 077.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SG02/00011**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 715 955.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/068951**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.01.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **21.08.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.10.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **21.03.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.07.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 9/80 (2006.01)**

C12N 15/57 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

A61K 38/50 (2006.01)

(73) Patentinhaber:

**Agency for Science, Technology and Research,
Singapur/Singapore, SG**

(74) Vertreter:

**Gille Hrabal Struck Neidlein Prop Roos, 40593
Düsseldorf**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**ZHANG, Lian Hui, Singapore 118699, SG; LIN, Yi
Han, Victoria 3073, AU; XU, Jin Ling, Singapore
118699, SG**

(54) Bezeichnung: **RALSTONIA AHL-ACYLASE GEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der molekularen Biologie. Insbesondere bezieht sich die Erfindung auf ein N-Acylhomoserinlacton-Acylasegen von *Ralstonia* sp. XJ12B.

[0002] N-Acylhomoserinlactone (AHLs), auch als Autoinduktoren bekannt, werden in vielen gramnegativen Bakterien in einem großen Umfang als quorumsensitive Signalmoleküle verwendet. Diese Verbindungen regulieren bestimmte Klassen von Targetgenen in Bakterien, wie Virulenzgene oder Biofilm-Differenzierungsgene. Im Allgemeinen sind quorumsensitive Moleküle hoch konserviert und teilen sich eine identische Homoserinlacton-Komponente. Die Länge und die Struktur von ihren Acylseitenketten sind jedoch unterschiedlich. Obwohl die durch AHLs regulierten Targetgene in unterschiedlichen Bakterienspezies variieren, sind die Grundmechanismen der AHL-Biosynthese und der Genregulation innerhalb der verschiedenen bakteriellen Arten konserviert.

[0003] Das allgemeine Merkmal der AHL-vermittelten Genregulation ist ihre Abhängigkeit von der Zellpopulation (Quorumsensitivität). Bakterien geben AHLs in ihre Umgebung ab und die extrazelluläre Konzentration der AHLs nimmt mit dem Wachstum der bakteriellen Zellpopulationen zu. Wenn AHL bis zu einer extrazellulären Schwellenkonzentration akkumuliert, wird die Expression von bestimmten Gruppen von Targetgenen in den Bakterien ausgelöst.

[0004] Bakterien, welche diese Signalfreisetzung verwenden, detektieren und reagieren auf die Akkumulation der AHL Signalmoleküle mit der Synchronisation der Expression einer besonderen Gruppe von Genen sowie mit der Koordination von zellulären Aktivitäten innerhalb der bakteriellen Zellpopulation. AHLs sind bei der Regulation einer Reihe von biologischen Funktionen beteiligt, einschließlich der Biolumineszenz in *Vibrio*-Arten (13, 4), dem konjugalen Transfer des Ti-Plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* (31), der Induktion von Virulenzgenen in *Burkholderia cepacia*, *Erwinia carotovora*, *Erw. chrysanthemi*, *Erw. stewartii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Xenorhabdus nematophilus* (3, 6, 12, 17, 19, 22, 23, 24, 26), Regulation der Antibiotikaproduktion in *P. aureofaciens* und *Erw. carotovora* (6, 26), Schwarmbeweglichkeit in *Serratia liquifaciens* (14) und Biofilmbildung in *P. fluorescens* und *P. aeruginosa* (1, 8). In vielen anderen Bakterienarten müssen die relevanten biologischen Funktionen, die von AHLs gesteuert werden, noch untersucht werden (2, 5, 11).

[0005] Eine Reihe von pflanzlichen, tierischen und menschlichen bakteriellen Pathogenen verwenden quorumsensitive AHL-Signale, um die Expression von pathogenen Genen zu regulieren und bei der Bildung von Biofilmen zu helfen. Deshalb sind die quorumsensitiven AHL-Signalmoleküle eine Gruppe von molekularen Zielen für die genetische und chemische Manipulation, da die Unterbrechung von diesen Signalmechanismen die Fähigkeit von diesen Bakterien, pflanzliche und tierische Gewebe zu infizieren oder Biofilme zu bilden, verhindert oder reduziert.

[0006] Das Gen, das ein AHL-Inaktivierungsenzym (AiiA) codiert, wurde aus einem grampositiven Bakterium (Bacillusstamm 240B1) kloniert (9). AiiA (auch bekannt als AHL-Lactonase) inaktiviert die AHL-Aktivität durch die Hydrolyse der Lactonbindung der AHLs (10). Die Expression von AiiA in transformierten *Erw. carotovora* (ein pathogener Stamm, der bei vielen Pflanzen Wurzelfäule verursacht) reduziert signifikant die Freisetzung von AHL, senkt die extrazellulären pektolytischen Enzymaktivitäten ab und schwächt die Pathogenität auf Kartoffel, Aubergine, Chinakohl, Karotte, Sellerie, Blumenkohl und Tabak (9). Transgenische Pflanzen, welche AHL-Lactonase exprimieren, zeigten eine signifikant gesteigerte Resistenz gegenüber einer *Erw. carotovora* Infektion und eine verzögerte Entwicklung von Symptomen der Wurzelfäule (10). AHL-Inaktivierungsmechanismen scheinen weit verbreitet zu sein. Es wurde zum Beispiel von einem bakteriellen Isolat von *Variovorax paradoxus* berichtet, das AHL-Moleküle als seine Energie- und Stickstoffquelle verwendet, was die mögliche Gegenwart von AHL-abbauenden Enzymen (18) anzeigt.

[0007] Weitere Verfahren, gegen eine AHL-vermittelte pflanzliche, tierische und menschliche Krankheit und gegen die Pflanzenpathogenvirulenz durch Störung bei der bakteriellen interzellulären Kommunikation einzuwirken, wären sehr wünschenswert.

[0008] Demgemäß wird in dieser Studie über die Klonierung und die Charakterisierung eines Gens berichtet, welche für eine AHL-Acylase aus dem bakteriellen Isolat *Ralstonia* sp. JX12B codiert.

[0009] Nach einer Ausführungsform stellt die Erfindung eine Nukleinsäure gemäß SEQ ID Nr. 1 bereit. Nach einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine Nukleinsäure bereit, welche die Nukleotide 1234-3618 von SEQ ID Nr. 1 umfasst.

[0010] Nach einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ein Peptid mit einer Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 2 oder mit einer Sequenz, welche die Aminosäuren 36-217 von SEQ ID Nr. 2 umfasst, oder ein Peptid mit einer Sequenz bereit, welche die Aminosäuren 233-794 von SEQ ID Nr. 2 umfasst.

[0011] Gemäß einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ein Peptid mit einer Sequenz bereit, die von einer Nukleinsäure codiert wird, welche aus den Nukleotiden 1234-3618 von SEQ ID Nr. 1 besteht.

[0012] Gemäß einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ein Peptid, wie oben beschrieben, bereit, welches AHL inaktiviert.

[0013] Gemäß einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ein in vitro Verfahren zur Modulation der AHL Signalaktivität bereit, welches das in Kontaktbringen von AHL mit einem oben beschriebenen Peptid umfasst.

[0014] Gemäß einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgenische Pflanze oder ein nicht-menschliches Säugetier bereit, welches eine oben beschriebene Nukleinsäure umfasst.

[0015] Gemäß einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine Nukleinsäure oder ein Peptid, wie oben beschrieben, zur Verwendung in der Therapie und die Verwendung von dieser Nukleinsäure und/oder dieses Peptides für die Herstellung eines Medikamentes zur Kontrolle einer bakteriellen Krankheit in einem Säugetier bereit, wobei die Expression der pathogenen Gene von diesen Bakterien durch AHL-Signale reguliert werden.

[0016] Gemäß einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ein Verfahren zur Steuerung einer bakteriellen Krankheit in einer Pflanze bereit, welches die Verabreichung eines Peptides, wie oben beschrieben, zu dieser Pflanze umfasst, wobei die Expression der pathogenen Gene von diesen Bakterien durch AHL-Signale reguliert werden. Alternativ umfasst das Verfahren die Transformation der Pflanze mit einer oben beschriebenen Nukleinsäure.

[0017] Die **Fig. 1** ist eine Photographie und zeigt Biotestergebnisse der AHL-Inaktivierung für bakterielle Kulturen und bakterielle Proteine aus den dargestellten bakteriellen Klonen. Die **Fig. 1A** zeigt die Ergebnisse eines Biotests mit bakteriellen Kulturen von *E. coli* DH5 α Stämmen 13H10 (Reihe 1), 2B10 (Reihe 2), MUB3 (Reihe 3), MUC6 (Reihe 4), GST-QsbA (Reihe 5) und GST (Reihe 6), welche die Plasmidklone oder Konstrukte p13H10, p2B10, pMUB3, pMUC6, pGST-QsbA bzw. pGST enthalten. Die **Fig. 1B** zeigt die Ergebnisse des Biotests für die angezeigten bakteriellen Proteine GST-QsbA und GST.

[0018] **Fig. 2** ist ein Diagramm und zeigt die Temperatur- und pH-Optimumprofile der AHL-Acylase.

[0019] Die **Fig. 3** ist eine graphische Darstellung und zeigt den Zeitverlauf der OOHL-Inaktivierung durch gereinigte AHL-Acylase.

[0020] Ein bakterielles Isolat von *Ralstonia* sp. XJ12B aus einer Biofilmprobe in einem Wasserbehandlungssystem war zur enzymatischen Inaktivierung von AHLs, bakteriellen quorumsensitiven Molekülen, in einem Biotest unter Verwendung von dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm Nt1 (*traR*; *tra::lacZ749*) als Indikator für die AHL-Aktivität in der Lage. Das Gen, welches für das Protein codierte, welches diese Enzymaktivität für die AHL-Inaktivierung (*qsba*) zeigte, wurde aus einem bakteriellen Stamm kloniert, der aus einer Biofilmprobe isoliert wurde. Das Gen codiert ein Peptid mit 794 Aminosäuren.

[0021] Bakterielle Kulturen und bakterielle Proteine wurde hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Inaktivierung von AHL unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* Indikatorzellen getestet. *A. tumefaciens* wurde bei 28°C in einem MM-Medium kultiviert, wie dies beschrieben ist bei Zhang et al. (31). Die Bakterien oder das zu testende Protein werden zunächst mit einem AHL-Substrat getestet, zum Beispiel N- β -Oxo-octanoyl-L-homoserinlacton (OOHL), und die Reaktion (Inaktivierung von AHL) wird laufen gelassen. Wenn eine AHL-Inaktivierungsaktivität in der Probe vorhanden ist (das heißt, AHL wird geschnitten und inaktiviert), werden die inaktivierten AHL-Produkte dann die Expression des *lacZ* Reportergens nicht auslösen können, das unter der Kontrolle eines *TraR*-abhängigen Promotors steht. Der Stamm *A. tumefaciens* NT1, der das *lacZ* Reportersystem enthält, wird somit in Gegenwart des Substrates 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-gal) nicht blau werden. Siehe Beispiel 2 für die Details dieses Biotests. Jedes AHL kann in dem Test, falls gewünscht, verwendet werden. Selbstverständlich kann jeder geeignete Test für die Spaltung von AHL, einschließlich traditioneller in vitro Enzymtests, verwendet werden, um die AHL-Inaktivierungsaktivität nachzuweisen. Fachleute

werden in der Lage sein, Tests zu modifizieren oder zu ergänzen, um die AHL-Inaktivierung nachzuweisen und/oder zu quantifizieren.

[0022] Der *Escherichia coli* Stamm DH5α wurde als Wirt für die DNA-Manipulation verwendet. *Ralstonia* sp. und *E. coli* wurden beide in einem LB-Medium (Trypton: 10 g/l, Hefeextrakt: 5 g/l und NaCl: 10 g/l; pH 7,0) bei 37°C kultiviert. Falls notwendig wurden geeignete Antibiotika mit den folgenden Konzentrationen zugesetzt: Ampicillin, 100 µg/ml; Tetracyclin, 10 µg/ml und Kanamycin, 20 µg/ml.

[0023] Das Gen, welches für das Protein codiert, das für die nachgewiesene AHL-Inaktivierung verantwortlich ist, wurde unter Verwendung einer Cosmidbibliothek von 1.600 Klonen mit der genomischen DNA von *Ralstonia* sp. Stamm XJ12B, konstruiert in *E. coli*, isoliert. Die *E. coli* Transfektanten wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Inaktivierung von AHL getestet. Ein Klon, p13H10, wurde hinsichtlich der Fähigkeit zur Inaktivierung von AHL gefunden. Die Cosmid-DNA aus p13H10 wurde geschnitten, in einen Klonierungsvektor fusioniert, ligiert und transformiert in *E. coli*. Die *E. coli* Klone wurden wiederum hinsichtlich ihrer Aktivität zur AHL-Inaktivierung getestet. Ein Klon, der ein 4 kb Insert enthielt, hatte die AHL-Inaktivierungsaktivität.

[0024] Die Plasmide wurden anschließend für die Sequenzierung gereinigt. Das 4 kb Fragment aus dem Klon p2B10 wurde vollständig gemäß bekannten Verfahren unter Verwendung von ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems) sequenziert. Siehe die folgende Tabelle I. Die Sequenz enthielt einen offenen Leserahmen von 2.385 Nukleotiden, der das AHL-Inaktivierungsgen, *qsba*, darstellte und für das vorhergesagte Polypeptid von 794 Aminosäuren (85.373 Daltons) codierte.

Tabelle I. *QsbA*-Gen (*Ralstonia* sp.) Nukleotidsequenz (SEQ ID Nr. 1).

gtttgggaagtggggnagcgcgctgtgcag	cgccccgccctcagccgcgagctcggcg	cgcaccgaatgcccgcgcccgggtggcgccc	90
ggcggctggccgggtgtggccggatcagg	cgccggaaggcggacatgtcgtgataaccg	cactgttcggcgattgcccgtcaggctcagc	180
gtgctgacttcagcagggtggcaggcgcgc	tccacgcgcagccgggtgcagcaattgcagc	ggcggagggtcccagggtcttggtgaaatgc	270
cgcagcagcgtgcgctcgctggtcgaggcg	gcyggcggccagcttggccagggtcgaacggc	tcgtgcagggtgctgctgcaggtagcggccg	360
gccccagtagaccagctggtgcggaatggcg	ggcttgcgtgcgcagccagatggcggtggac	tcaccgcgcgacgggtgctcgagcacggcc	450
tgccgaggggtgctgcccagccgggtgtcg	gccaggcggccgaccaggcgtcgtgagc	gccacgcgctgctccatcgcgcgcgccc	540
agcacgttgccgctgctgagatggcctgc	tcgcgccacccttcaagctgcccggtagttg	ccgtgcagccagccggcagcagccagctc	630
accgtcaagcgcggcggcgggcagcgcgc	ccggccagcagccgacgcgggtgaaaggac	gaggccaccaagcctgcccggcgtccaggtg	720
gcccggatggtggcggctcccactccag	cagggccaggcgtgctccagcgtgctgat	gtggtcgaaatgcaggggcgggagcagccag	810
cgctgcggcagcgcggcgtcggccgcgg	cagcggctggcagcggcaggccagggctc	ggcggcgccctgcccagcggggcggttcgcg	900
cgcgaccagccgccaccggaacaccgggct	ggcggcatcggcagcgttgcggcgtgcat	ggaggcgagcgcattggccacggccgagggt	990
gtcggcgacggtcgcagcgtggagaggcc	ggcgtcgggaaaggtcagcaggtcagatgc	ggcatcccgaagtataggggagggcgggcg	1080
gaggcctcctcgtggtgggattgaccccc	actctggcgggaatcctcttccctcgggg	cgggccccagtcagcagatcggcggtggct	1170
gqgcctgcgcggcgcgcaagactagagcg	acacaagacaagaccgacaacagggaqcaa	cgcatgtagcagggttccggcgtccggcggc	1260
ACGCTCGCATGGCCCGCTCGCGGCGTG	GCCGSGCTGCGCCAGTTCACCAGTGGCCCG	TGGGGTTCGCTCAGCGACACCGGCTGTCC	1350
GCCGAGATCCGCGCACCGCTTCGGCATT	CCGCACATCCGCGCCAAAGCACTACGCCAGC	CTCGGCTATGGCATGGCTATGGCTACGGC	1440
CAGGACAACTGTGCTGCTGGCCGACCAG	GTGGTCAACCGTCAACGGCGAGCGCTCGAAG	ACCTTCGGGCGCCGAGGGCACCCTGACGGTC	1530
TCGTTCAAGCCGATCCCAACTGCACTCG	GACGCCTTCTTCAAGGGCATCTTCGACGAG	GACGGCTGCGCGCCGGTATGCGCAGATG	1620
TCGCCCAGGGCGCGGAGCTGCTGCGCGGC	TACATCGCCGGCTTCAACCGCTATCTCAAG	GACACGCCCGCCCAACTTCCCGGCGGCC	1710
TGCCGCAATGCCGCTGGGTGCGTCCGCTC	ACGCTGGCGGACATGATACCAGTGGCGAA	GAGAAGCGGATCCAGGGCCAGCGCGCCGC	1800
ATGCTGGCGGGCATCGCTCGCCCGCAGCCG	CCGGCCCGCACGCCGGTGGCCGAGCCGCGAG	ATTCGCGCGCAGGCCGTCGACACCGTGGCG	1890
CTGGACCGCGAAGTGCAGCTGCGCGACATG	CCGATCGGCTCCAACGGCTGGCCCTTCGGC	GCTGACGCCACCGCCAAACCGGCGCGGGTG	1980
CTGCTCGGCAATCCGCACTTCCCCTGGACG	ACCACCAACCGCTTCTACCAGTTCACCTG	ACGGTGGCCCGCAAGCTCGACBTGATGGCC	2070
GCCTCGATCGCGGCTTCCCCTGGTGGAGC	ATCGGCTTCAACAAGGACGTTGGCGTGGACG	CACACCGTCTCACCGCGCCGCGCTTACC	2160
TTGTTCAAGTGAAGTGGCCGAAAGGCGCAC	CCGACCACTACTGGTTCGACGGCAGCGCG	CACAAGATGACCACCGCACGGTTCGCCCTC	2250
GACGTGAAGCTGCCGACGGCCGCTCGAG	CGCGCACGCAACCTTCTACGACACCATC	TACGGCCCGGTGCTGTGATGCCGAGCGGC	2340
GGCATCCCGTGGACACCGCAAGGCCTAC	GCCCTGCGCGACGCCAACCGCAACAACAG	CGCTCGGTGACAGCTGGCTGCATATCGGG	2430
CAGGCCCGGAGCTGGCCGGCATCCGCCAG	GCCATCGGCAACTGGGCACTTCCCTGGGTC	AACACCATGCCACCGCACCGCAACGGCCGC	2520
GCGCTGTCGCCGAGTGTGACCAACGCCG	GACGTGCGCGGCGCGGCTCCAGCGCTGT	GCCCGCTCGCGGCTGGCCGCAACTCTTC	2610
AAGGACCGGGGCTGCTGCTGCTCGACGGC	TCGCGCGGCACCTGCAACTGGCAGGTGAT	CCGGCTTCGCGGATCCCGGGCTGGTGGCG	2700
CCCGCGCATGCCGCTGCTCGAGCGCGAC	GACTACGTGCGCAACAGCAATGACAGCTCC	TGGCTGACCAACCCCGCCAAAGCTGACC	2790
GGCTTCTCGCCGCTGATGGGCTCGTTCGAC	GTACCGCAGCGGCTCGGCAACCGCATCGGC	CTGATCGAGATCGGCGCGCCCTGGCCGGC	2880
ACCGACGGACTGCCCGCAACCGCATCGAT	CTGCCGAACCTGCAGGCATGATCTTCAGC	AATGCCAACCTGGCGGGACAACCTGGTGTG	2970
GGCGACTGCTCGCGCATGCAAGGCCAG	CCGGCCCGGATGCCGACGTGCGCGACGGC	TGGCCCGCCCTGCCCACTGGGAACCGCAC	3060
AGCAACGCCGACGCCCGCGCCCGCACCTG	TTCCGCGAGTTCGGATGCGCGCCAAAGGAC	ATCGCGCAGGTGCACGGCGCTGAGTTCGAC	3150
CCGGCCGACCCGGTCCACACGCCCGCGCGC	CTGCGCATGAACGACCGCAGGTACAGCACG	GCGGTGTTCAAGGCGCTGAAGGAAGCCGTG	3240
GGCGCGGTGCGCAAGCGGGCTTCGCGCTG	GATGCCCGCTGGGCACGGTACAGGCCGCG	CACGCACCGGACGGCTCCATCGCCCTGCAC	3330
GCGCGGAGGAATACGAAGCGGTGCTCAAC	AAGCTGCAAAACCTCGCGATCGGGCCGAA	GGGCTGCCGGTGTATTTCGGCACCGACTAC	3420
ATCCAGACCGTACCTTCGACGACCAAGGGC	CCGTGCGCGACGCCATCTCACCTACGGC	GAATCGACCGACCGCCCTCGCGCGACGGC	3510
TTCCAGCAGATGCGTGCCTACTCGGGCAAG	CCTGGAACCGGCTGCCGTTCTCCGAAGCG	GCCATCGCGGCGCATCCGGCGCTGAAGGTG	3600
ATGCGGTGTCGCACTGAGggctgcgggtg	cctggaaaaacgccccgcttgcggyggcg	tttttttgcagtgatgaggtcaatcgt	3690
gttggaaaccgcatccggacatgactgata	tgtgactctgcctgtgtccggtg		3743

[0025] Der vorausgesagte offene Leserahmens des *qsba*-Gens ist in Großbuchstaben dargestellt, wobei das Startcodon und das Stoppcodon in Fett dargestellt sind. Eine mutmaßliche Ribosomenbindungsstelle (AGGA-GA) ist unterstrichen.

[0026] Die Sequenzanalyse von diesem Peptid zeigte, dass *QsbA* keine signifikante Homologie mit dem bekannten, quorumsensitiven AHL-Lactonase -Molekülinaktivator zeigt, der von dem *aiiA*-Gen aus *Bacillus* sp.

240B1 codiert wird. Die abgeleitete Peptidsequenz war jedoch typisch für die Primärstruktur von Aculeacin A Acylasen (AACs) und Penicillin G Acylasen mit einer Signalpeptid- α Untereinheit-Spacer- β Untereinheit-Organisation (16, 30). Die *Ralstonia*-Sequenz teilt sich eine substantielle Identität mit den AACs aus *Deinococcus radiodurans* Stamm R1, *Actinoplanes utahensis* und einer mutmaßlichen Acylase aus *Pseudomonas aeruginosa*, die alle die Desacylierung ihrer Substrate katalysieren. Diese AAC-Gene werden als einzelnes Vorläufer-Polypeptid translatiert und dann zu der aktiven Form verarbeitet, die zwei Untereinheiten hat. Aculeacin A ist ein pilzwirksames Antibiotikum des Echinocandin-Typs mit einer langen Fettsäure-Seitenkette. Aculeacin A Acylasen, die aus *A. utahensis* gereinigt sind, katalysieren die Hydrolyse der Amidbindung an der Palmitoyl-Seitenkette von Aculeacin A (29). Die Primärstruktur des Proteins sowie die Enzymaktivitätsanalyse mit verschiedenen Substraten, die unten diskutiert wird, zeigen somit, dass *qsba* für eine AHL-Acylase codiert, welche die Amidverbindung zwischen der Acylseitenkette und der Homoserinlacton-Komponente der AHLs spaltet.

[0027] Die vermuteten α und β Untereinheiten von QsbA sind an den Aminosäurepositionen 36-217 bzw. 233-794 von SEQ ID Nr. 2 lokalisiert, wobei dazwischen ein Spacer von 15 Aminosäuren liegt, gemäß der Bestimmung durch vergleichende Anordnung mit den Peptidsequenzen aus *D. radiodurans* Stamm R1, *A. utahensis* und *P. aeruginosa*. Siehe Tabelle II.

Tabelle II. Ausgerichtete Aminosäuresequenzen von QsbA aus *Ralstonia* sp. XJ12B (SEQ ID Nr. 2), *D. radiodurans* Stamm R1 Acylase (SEQ ID Nr. 3), *A. utahensis* Acylase (SEQ ID Nr. 4) und *P. aeruginosa* Acylase (SEQ ID Nr. 5).

<i>R. sp</i>	MMQGF---ALRGTLAMAALAALAGCA-----SSTDGRWGSLSDTGLSAEIRRTGFGIPIHIRANDYASLGYGMAYAYAQDN	72
<i>D. rad</i>	MSR----SPFSSVSLPARLLLSLL-----LGPLMLGGAASAQTYQVQIQRTAIGIPIHQASDLGGIGYGVGYSYAQDN	70
<i>A. uta</i>	MTSSY---MRLKAAAIAGFVIVATAA-----VSPSPAS-GREHDGGYAALIRRASYGVPVPHITADDFGSLGFGVGVQAEDN	71
<i>P. aer</i>	MSRPFRRPLCRETTSMGMRVLTGLAGMLLGSMPVQADMPRPTGLAADIRWTAYGVPHIRAKDERGLGYGIGYAYARDN	80
	* : : : . * : ..*:*** *.* .*:*:.* *.**	
1		
<i>R. sp</i>	LCLLADQVVTVNGERSKTFEGTIVTVSFKPIPNLQSDAFFKGIFFDEDGLRAGYAQMSPEARELLRGIAGFNRYLKDTP	152
<i>D. rad</i>	LCLLADQVMTVRGERSKFLGAEGETTVVGFQPVNNLDSVFFKTVIEPGRLOAGYRDQ-PQILALMRGVAGVNRYLSDTP	149
<i>A. uta</i>	ICVIAESVVTANGERSRWFGATGPDADVRTSSTQAIDDRVAERLLEGPRDGVRAFCDDVDRDQMRGFFVAGYVNHFLRRTG	151
<i>P. aer</i>	ACLLAEEIVTARGERARYFGSEGKSSAELD---NLPSDIIFYAWLNQPEALQAFWQACTPAVRQLLEGYAAGENRFLEARD	157
	::*:~::~*~.*::~: . * . . . :	
<i>R. sp</i>	PANFP-AACRNAAWVRPLTLGDMMRMGEEKAIQASAGAMLAGIVAAQPPGRTPVAEREIYPQAVDVTALDRELQLRDMPI	231
<i>D. rad</i>	PEQWP-SACRNADWVRPLTELDMVRMGEEKAIQASAGAMVSAITSARPPQ---AGASTAAPRPDLAAFNRYRFENDLPI	224
<i>A. uta</i>	VHRLTDPACRGKAWVRPLSEIDLWRTSWDSMVRAGSGALLDGVVAATPPT---AAGPASAPEAPDAAAIAAALDGTSAI	228
<i>P. aer</i>	GKTTSS---CLGQPLRRAIATDDLRLRLRLLVEGGVGQFADALVAAAAPPG---AEKVALSGEQAFQVAEQRRQRFRLER	230
	. * . .*:~::~: *: * :... * : .*:~::~: ** *	
1—————		

```

R.sp      GSNGWAFGADATANRRRVLLGNPHFPWTTTNRFYQVHLTVPGKLDVMGASIAAFPVVSIGFNKDVAVWHTVSTGRRETFLF 311
D.rad     GSNGWAFGSEATTNGRGLLLGNPHFWETSNRFYQLHLTLPGQFDVMGASLGMPVNVNIGFNQDVAVWHTVSTDKRFTLA 284
A.uta     GSNAYGLGAQATVNGSGMVLNPHFPWQGAERFYRMHLKVPGRYDVEGAALIGDPIEIGHNRTVAWSHTVSTARRFVWH 288
P.aer     GSNAIAVGSEASADGKMLLANPHFPWNGAMRFYQMLHTIPGRLDVMGASLPLGVVNI GF SRHLAWHTVDTSSHFTLY 290
          *** ..*:: :. : *::*.***** : ***:*.::: ** *::. . *::*..: :*:***.* :*.

R.sp      ELKLAEGDPTTYLVDGTPHKMTTRTVAFDVKLPDGRLEERTHTFYDTIYGFVLSMPSGGMPWTTQKAYALRDANRNNTRS 391
D.rad     ALTLVPGDPLSYVKDGOQRRLQRRRTAVIEVKTANG-PRLHTRTVYFTPEGPLVNLPAAGLTWTPQYAFALRDANRNNTRM 383
A.uta     RLSLVPGDPTSYVVDGRPERMRARTVTVQTGSG-----PVSRTFHDTRYGPVAVVP-GTFDWT PATAYAITDVNAGNNRA 383
P.aer     RLALDPKDPRRYLVDGRSLPLEEKSVAIEVRGADGKLSRVEHKVYQSIYGPLVWVP-GKLDWNRSEAYALRDANLENTRV 390
          * * ** * ** : :..... :... : ** : * . : * . *::: *.* *.*

R.sp      VDSWLHIGQARDVAGIRQAIG-NLGI PWNTIATDRNGRALFADVSTTDPVPAELQRCAPSPLAGKLFKFDAGLVLLDGS 470
D.rad     LATWLGFAKSVRDIRASLN-VQGI PWNTIADRAGSALYADISSPNVSAQQOACTPPPLA-PLFPAAGLAVLDGS 461
A.uta     FDGWLRMGQAKDVRALKAVLDRHQELPWNVIAADARGEALYGDHSVVPRTGALAAACIPAPFQ-PLYASSGQAVLDGS 461
P.aer     LQQWYSINQASDVADLRRRVEALQGI PWNTLAADQENALYMNQSVVYLPKPELIPACAI PQLV-----AEGPALQGG 464
          . * : * .* :: : :*****:*.* **:: : * * : * . : * *::.

R.sp      RGTCNQVDPASPVPLVAPARMPVLERDDYVANSNDSSWLTNPAQKLTGFSPVMGSVDVPQRLRTRIGLIEIGRRLAGT 550
D.rad     HSACDWKTFPASRVPLRAPDKMPVLRQDFVANSNNSAWLANPAAPQTGLDPLVGEVNAPOSPTRMGLLEIGRRLSGT 541
A.uta     RSDCALGADPDAAVFGILGFASLPVRFDDYVNSNDSHWLASPAAPLEGFPRLGNERTPRSLRTRLGLDQIQORLAGT 541
P.aer     DSRCAWSRDPAAAQAGITPAAQLPVLLRRDFVQNSNDSAWLTNPASPLQGFSPVLSQE-KPIGPRARYALSRLQKQP-- 543
          . * ** : .*: . : ** * *:* **:* **.* * : :...

R.sp      DGLPGNRIDLPNLQAMIFSNANLAGQLVLGDLAACKATPAPDAD-----VRDGCALGQWNRTSNADA-RAHLFREF 630
D.rad     DGLPGRTFDIPTLQATLLRESNLTGEMAAADAKLQS--AGGAE-----LQPACNALAAWDRSSQES-RGAALWREF 619
A.uta     DGLPGKGFFTARLWQVMFGRNMHGAELVRDDLVALCRRQPTATASNGAIVDLTAACTALSRFDERADLDS-RGAHLFTEF 621
P.aer     -----LEAKTLEEMVTANHVFSADQVLPDLLRLCRDN-QGEKS-----LARACAALAQWDRGANLDSGSGFVYFQRF 613
          : * : : .: * * : . : .* ** .: . : : . : .*

R.sp      WMRAKDIAQVHAVEFDPADPVHTPRGLR-MNDATVRTAVFKALKEAVGAVRKAGFALDAPLGTVQAAHAPDGSIALHGGE 702
D.rad     WRRARAI PNVIYAVFDPADPVNTPRGLN-TADPAAQTALLGALREAAALTAAGIPFDAPLGEVQGVVRGGDFISLPGGA 691
A.uta     LAGG----IRFADTFEVTDPVRTPAPFWNTTDPVRVRLADACNGSPASPSTR-----SVGDIHTDSRGERRIPIHGR 690
P.aer     MQRFAELDGAWKEPFDAQRPLDTPQGIA-LDRPQVATQVRQALADAAAEVEKSGIPD GARWGLQVSTRQERIAIIPGGD 686
          *: *:* ** : . . * : * : . * :: *:: **

R.sp      EYEGVLNKLQTLPIGPKGLPVYFG--TSYIQTVTDDQGPVADAILTYGESTDHASPHAFDQMRAYS GKHWNR LFPFSEA 780
D.rad     EFEGVLDKIDFNPLAPGGYRGVVG NASSYIQTVGFTDSGVQAEAVLTYSQSSNPESPFSDQTRLFSRSEWVKLPFTQPE 771
A.uta     GEAGTFNVITNPLVPGVGYPVVHG-TSFVMAVELGPHGFSGRQILTYAQSTNPNSPWYADQTVLYSRKGWDTIKYTEAQ 769
P.aer     GHFGVYNAIQS--VRKGDHLEVVG--TSYIQLVTFPEEGPKARGLLAFSQQSDPRSPHYRDQTELF SRQQWQTLFPFSDRQ 763
          *. : : : . . :*:: * : * . :*::*:: ** ** *.* * : : :

R.sp      IAADPALKVMRLSQ--- 794
D.rad     IEADPTRTVVQLSE--- 785
A.uta     IAADPNLRVYRVAQRGR 786
P.aer     IDADPQLQRLSIRE--- 777
          * *** : :
    
```

* = identische Reste; : = konservierte Substitutionen; . = semi-konservierte Substitutionen;
| = post-translationale Verarbeitungsstellen für Signalpeptid und Untereinheiten; - = Spacer.

[0028] Die codierende Region des qsbA-Gens wurde mittels PCR amplifiziert. Die amplifizierten PCR Produkte wurden geschnitten, in die codierende Sequenz des Glutathion S Transferase (GST) Gens gemäß dem Leseraster angeordnet und in E. coli exprimiert. Die Proteinextrakte von den rekombinanten E. coli Zellen wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Inaktivierung von AHL getestet. Proteine aus E. coli, die GST alleine exprimierten, dienten als Kontrolle. Die Ergebnisse zeigen, dass das GST-QsbA Fusionsprotein die AHL-Aktivität effektiv eliminierte. Siehe [Fig. 1B](#).

[0029] Die Substratspezifität von QsbA wurde durch Test des gesamten löslichen Proteins, welches aus re-

kombinanten *E. coli* (pGST-QsbA) extrahiert wurde, auf Inaktivierung von AHLs unter Verwendung von Substraten mit Acylketten von unterschiedlichen Längen bestimmt. QsbA war fähig zur vollständigen Inaktivierung von 3-Oxogruppe-Acyl-HSLs mit Acylketten von 8, 10 und 12 Kohlenstoffatomen. QsbA inaktivierte auch stark Methylengruppe-Acyl-HSLs mit Acylketten von 8 und 10 Kohlenstoffatomen. QsbA inaktivierte auch die Butyl- und Hexylester von N- β -Octanoyl-L-homoserin, während die AHL-Lactonase, die durch *ahhA* codiert wurde, nicht zu deren Inaktivierung in der Lage war. Die Daten der Substratspezifität zeigen, dass QsbA eine AHL-Acylase ist.

[0030] QsbA und qsbA stellen neue Werkzeuge für die Herabregulierung von AHL-vermittelten, biologischen Aktivitäten dar, wie die Expression von Virulenzgenen und die Biofilm-Differenzierung in pathogenen Bakterien, beides *in vitro* und *in vivo*. Das qsbA Gen, welches für das AHL Inaktivierungsenzym (QsbA) codiert, oder ein funktionelles Fragment, eine Untereinheit oder eine im wesentlichen homologe Variante davon können in ein pflanzliches Genom eingeführt werden, um eine genetisch modifizierte Pflanze mit der Fähigkeit herzustellen, einen quorumsensitiven pathogenen Signalstoff zu löschen. Transgenische Pflanzen, die ein Enzym exprimieren, welches AHLs inaktiviert, können eine signifikant gesteigerte Resistenz gegenüber einer Infektion durch bakterielle Pathogene zeigen, selbst wenn die Bakterien in hohen Konzentrationen vorhanden sind.

[0031] Verfahren zur genetischen Manipulation und Transformation von pflanzlichen Zellen sind im Stand der Technik gut bekannt sowie Verfahren zur Regeneration von fertilen, lebensfähigen, transformierten Pflanzen. Allgemein kann jedes Verfahren zur Klonierung der codierenden Region von qsbA oder eines funktionellen Fragmentes oder einer im wesentlichen homologen Variante davon in einen geeigneten Expressionsvektor verwendet werden. Es ist günstig, die qsbA codierende Region in einen Vektor zu ligieren und anschließend durch Ligation in einen pflanzlichen Transformationsvektor, wobei jedoch Fachleuten auf dem Gebiet auch alternative Verfahren zur Erzielung der gleichen Ergebnisse bewusst sein werden. Jeder geeignete pflanzliche Transformationsvektor kann verwendet werden. Der Vektor enthält das qsbA Gen oder ein funktionelles Fragment, eine Untereinheit oder eine im wesentlichen homologe Variante davon solange wie die Expression des Gens zu einem QsbA Protein oder einem funktionellen Fragment, einer Untereinheit oder einer Variante davon führt, die AHL inaktiviert.

[0032] Ein funktioneller Promotor steuert vorzugsweise die Expression. Viele geeignete Promotoren sind im Stand der Technik bekannt, so dass ein geeigneter Promotor von einem Fachmann in Abhängigkeit von dem verwendeten Expressionssystem einfach ausgewählt werden kann. Solch eine Auswahl eines geeigneten Promotors, um das gewünschte Niveau der translationalen Expression zu erzielen, wird als Routine im Stand der Technik angesehen. Es ist zum Beispiel vorteilhaft, die qsbA Expression durch die Modifikation der Codonverwendung und durch Kopplung an einen starken Promotor, wie der doppelte 35S Promotor, zu optimieren.

[0033] Ein geeignetes Markergen, wie die Kanamycinresistenz, das grüne Fluoreszenzprotein oder jeder andere geeignete Marker, wird vorteilhaft verwendet. Variationen der allgemein verwendeten und gut bekannten Verfahren für die Transformation von Pflanzen mit einem Gen, sind für den Fachmann auf dem Gebiet der genetischen Manipulation von Pflanzen gut bekannt. Expressionskonstrukte können eine Signalsequenz enthalten, um die Sekretion des exprimierten QsbA Proteins zu steuern, oder, falls gewünscht, kann eine solche Sequenz fehlen. Die pflanzlichen Transformationsvektoren, die das qsbA Gen und ein Markergen enthalten, können verwendet werden, um pflanzliche Zellen unter Verwendung der Agrobacterium-vermittelten Transformation zu transformieren. Die Agrobacterium-vermittelte Transformation wird geeignet verwendet, um Pflanzen mit dem qsbA Gen zu transformieren, wobei jedoch in Abhängigkeit von der zu transformierenden Pflanze auch andere geeignete Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, verwendet werden können. Zum Beispiel werden bestimmte monokotyle Pflanzen effizienter transformiert durch die Anwendung von anderen Verfahren, wie die Beschießung mit Mikroprojektilen, die Vakuumfiltration oder jedem anderen Verfahren, das im Stand der Technik bekannt ist, um DNA Plasmide oder Fragmente in das pflanzliche Genom einzuführen und zu integrieren. Fachleute auf dem Gebiet kennen Mittel, um Gymnospermen, Monokotyle und Dikotyle zu transformieren. Alle diese im Stand der Technik bekannten Verfahren werden für die Verwendung bei der Erfindung beachtet.

[0034] Nach Auswahl der Transformanten, welche das qsbA Gen tragen, werden transgenische Pflanzen gemäß bekannten Verfahren regeneriert. Auf ein Markergen selektierte Pflanzen, zum Beispiel Kanamycinresistenz, können getestet werden, zum Beispiel durch PCR- und DNA-Gelblot, um zu bestimmen, wie viele Kopien des qsbA Gens in dem pflanzlichen Gewebe vorhanden sind. Jedes im Stand der Technik bekannte und geeignete Verfahren wird dabei beachtet zur Verwendung mit dem Gen gemäß der Erfindung. Die QsbA Enzymaktivität kann in transgenischen Pflanzen, die mit dem qsbA Gen transformiert sind, durch das Biotestverfahren nachgewiesen werden, welches im Beispiel 2 beschrieben ist, oder durch jedes geeignete Verfahren.

[0035] Mit „funktionelles Fragment, Untereinheit oder eine im wesentlichen homologe Variante davon“ ist bei Bezug auf eine qsbA Nukleotidsequenz jedes Fragment, Untereinheit, Variante oder homologe Sequenz von qsbA gemeint (Nukleotide 1234-3618 von SEQ ID Nr. 1), die für ein Protein oder eine Peptidsequenz codiert, welche zur Inaktivierung von N-Acylhomoserinlactonen in der Lage ist. „Im Wesentlichen homologe Varianten“ einer Nukleotidsequenz sind im Allgemeinen solche, deren Komplement mit qsbA unter stringenten oder hochstringenten Bedingungen hybridisiert, zum Beispiel bei Temperaturen von etwa 30°C bis etwa 50°C, zum Beispiel 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C oder 50°C, und/oder bei Salzkonzentrationen von etwa 200 mM bis etwa 1.000 mM NaCl oder die äquivalente ionische Stärke, zum Beispiel 200 mM, 250 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, 750 mM oder 1.000 mM. Die stringenten Bedingungen sind abhängig von der Länge der Nukleinsäure und der Basenzusammensetzung der Nukleinsäure und können durch im Stand der Technik bekannte Techniken bestimmt werden. Fachleute auf dem Gebiet sind familiär mit diesen Bedingungen und Bereichen, die nützlich sind. Im Allgemeinen ist eine im Wesentlichen homologe Nukleotidsequenz wenigstens zu etwa 75 % homolog zu SEQ ID Nr. 1 oder einem Fragment oder einer Untereinheit davon, vorzugsweise wenigstens zu etwa 85 % homolog und am meisten bevorzugt zu 90 %, 95 % oder 99 % homolog oder mehr.

[0036] Die Fachleute sind vertraut mit der Degeneration des genetischen Codes und sind sich somit bewusst, dass Nukleinsäuresequenzen weniger als 100 % homolog sein können und dennoch für das gleiche Protein oder die gleiche Peptidsequenz codieren können. Solche Variationen in jeder der Sequenzen, Fragmente, Untereinheiten oder der im wesentlichen homologen Varianten werden auch als Teil von dieser Erfindung erachtet.

[0037] Peptid- und Proteinsequenzen, die von dieser Erfindung umfasst sind, umfassen alle Sequenzen, die durch das qsbA Gen oder einem Fragment, einer Untereinheit oder einer im wesentlichen homologen Variante davon codiert werden. Solche Sequenzen umfassen somit jedes funktionelle Protein oder Peptid, welches die Fähigkeit zur Inaktivierung von AHL zurückbehält, einschließlich Protein- und Peptidfragmente des vollständigen QsbA Proteins, wie zum Beispiel die Sequenzen der Aminosäuren 36-217 und 233-794, die von SEQ ID Nr. 1 und im wesentlichen homologen Varianten davon codiert werden. Eine im wesentlichen homologe Variante des QsbA Proteins umfasst Sequenzen, die zu wenigstens etwa 50 % homolog sind, vorzugsweise wenigstens etwa 60 % homolog und am meisten bevorzugt 70 %, 80 % oder 90 % homolog oder mehr sind. Somit ist ein Protein, das eine substantiell homologe Variante von QsbA darstellt, zu etwa 50 % bis etwa 99,9 % homolog zu QsbA. Konservative und nicht-konservative Aminosäuresubstitutionen werden beide beachtet, sowie Sequenzen, die nicht-traditionelle oder modifizierte Aminosäuren, wie solche, die im Stand der Technik bekannt sind, enthalten.

[0038] Der Ausdruck „Fragment“ soll jeden Nukleotidabschnitt von SEQ ID Nr. 1 oder jede Protein/Peptidsequenz von SEQ ID Nr. 2 anzeigen, das größer ist als etwa 300 Nukleotidbasen oder etwa 100 Aminosäuren und bis zu einem Nukleotid oder einer Aminosäure weniger als die gesamte Sequenz. Der Ausdruck „Untereinheit“ soll jede funktionelle Einheit des QsbA Proteins umfassen, wie zum Beispiel die Aminosäuren 36-217 oder 233-794 von SEQ ID Nr. 2.

[0039] Eine Protein- oder Peptidsequenz, die hinsichtlich der Inaktivierung von N-Acylhomoserinlactonen berücksichtigt wird, ist jede Sequenz, die zur Inaktivierung von wenigstens 55 pMolen N-Acylhomoserinlacton (OOHL) pro µg Protein pro Minute bei 30°C in der Lage ist.

[0040] Es wurde zuvor gezeigt, dass die Löschung der bakteriellen Quorumsensitivität durch die Inaktivierung von N-Acylhomoserinlacton mit AHL-Lactonase eine bakterielle Infektion stoppt (9, 10). Das hier beschriebene Gen und Protein, welches wahrscheinlich eine AHL-Acylase ist, stellt ein neues und wirksames Mittel zur Inaktivierung von AHL Signalen dar und kontrolliert somit eine bakterielle Infektion. In ähnlicher Weise zielten das hier beschriebene Gen und Protein auf die quorumsensitiven AHL Signale, welche die Expression von pathogenen Genen von vielen bakteriellen Pathogenen mit einer Schwellenkonzentration regulieren. Dieses Werkzeug ist auf alle pflanzlichen, tierischen und menschlichen Krankheiten anwendbar, wo die Expression der pathogenen Gene der bakteriellen Pathogene durch AHL Signale aktiviert werden, wie zum Beispiel die pflanzliche Pathogene *Erw. carotovora*, *Erw. chrysanthemi*, *Erw. stewartii*; die menschlichen Pathogene *P. aeruginosa*, *B. cepacia* sowie die tierischen Pathogene *X. nematophilus*, *P. fluorescens* (1, 3, 6, 12, 17, 19, 22, 23, 24, 26).

Literaturverzeichnis

1. Allison, et al., "Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms," *FEMS Microbiol. Lett.* 167:179-184, 1998.

2. Bassler, et al., "Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*," *J. Bacteriol.* 179:4043–4045, 1997.
3. Beck von Badman, and Ferrand, "Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acyl homoserine lactone autoinducer," *J. Bacteriol.* 177:5000–5008, 1995.
4. Cao and Meighen, "Purification and structural identification of an autoinducer for the luminescence system of *Vibrio harveyi*," *J. Biol. Chem.* 264:21670–21676, 1989.
5. Cha et al., "Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant associated bacteria," *Mol. Plant Microbe Interact.* 11:1119–1129, 1998.
6. Costa and Loper, "EcbI and EcbR: homologs of LuxI and LuxR affecting antibiotic and exoenzyme production by *Erwinia carotovora* subsp. *betavasculorum*," *Can. J. Microbiol.* 43:1164–1171, 1997.
7. Daumy et al., "Role of protein subunits in *Proteus retigeri* penicillin G acylase," *J. Bacteriol.* 163:1279–1281, 1985.
8. Davies et al., "The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm," *Science* 280:295–298, 1998.
9. Dong et al., "AiiA, an enzyme that inactivates the acyl homoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3526–3531, 2000.
10. Dong et al., "Quenching quorum sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase," *Nature* 411:813–817, 2001.
11. Dumenyo et al., "Genetic and physiological evidence for the production of N-acyl homoserine lactones by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and other fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas* species," *Eur. J. Plant Pathol.* 104:569–582, 1998.
12. Dunphy et al., "A homoserine lactone autoinducer regulates virulence of an insect-pathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae)," *J. Bacteriol.* 179:5288–5291, 1997.
13. Eberhard et al., "Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase," *Biochemistry* 20:2444–2449, 1981.
14. Eberl et al., "Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*," *Mol. Microbiol.* 20:127–136, 1996.
15. Fuqua and Winans, "Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes," *J. Bacteriol.* 178:435–440, 1996.
16. Inokoshi et al., "Cloning and sequencing of the aculeacin A acylase-encoding gene from *Actinoplanes utahensis* and expression in *Streptomyces lividans*," *Gene* 119:29–35, 1992.
17. Jones et al., "The Lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determination in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*," *EMBO J.* 12:2477–2482, 1993.
18. Leadbetter and Greenberg, "Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum sensing signals by *Variovorax paradoxus*," *J. Bacteriol.* 182:6921–6926, 2000.
19. Lewenza et al., "Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI," *J. Bacteriol.* 181:748–756, 1999.
20. Matsuda and Komatsu, "Molecular cloning and structure of the gene for 7 β -(4-carboxybutanamido)cephalosporadic acid acylase from a *Pseudomonas* strain," *J. Bacteriol.* 163:1222–1228, 1985.
21. Matsuda et al., "Nucleotide sequence of the genes for two distinct cephalosporin acylases from a *Pseudomonas* strain," *J. Bacteriol.* 169:5821–5826, 1987.
22. Nasser et al., "Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* *expl-expR* locus directing the synthesis of two N-acyl-homoserine lactone signal molecules," *Mol. Microbiol.* 29:1391–1405, 1998.
23. Passador et al., "Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication," *Science* 260:1127–1130, 1993.
24. Pearson et al., "Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:197–201, 1994.
25. Piper et al., "Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction," *Nature* 362:448–450, 1993.
26. Pirhonen et al., "A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*," *EMBO J.* 12:2467–2476, 1993.
27. Schumacher et al., "Penicillin acylase from *E. coli*: unique gene-protein relation," *Nucleic Acids Res.* 14:5713–5727, 1986.
28. Staskawicz et al., "Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*," *J. Bacteriol.* 169:5789–5794, 1987.
29. Takeshima et al., "A deacylation enzyme for aculeacin A, a neutral lipopeptide antibiotic, from *Actinoplanes utahensis*: purification and characterization," *J. Biochem.* 105:606–610, 1989.
30. Verhaert et al., "Molecular cloning and analysis of the gene encoding the thermostable penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*," *Appl. Env. Microbiol.* 63:3412–3418, 1997.
31. Zhang et al., "Agrobacterium conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones," *Nature*

362:446–447, 1993.

[0041] Die folgenden Beispiele sollen die hier beschriebene Erfindung veranschaulichen, wobei sie aber nicht als Einschränkungen der beigefügten Ansprüche ausgelegt werden sollen.

Beispiele

Beispiel 1. Bakterielle Isolierung.

[0042] Eine bakterielle Biofilm probe wurde aus einem Wasserbehandlungssystem gesammelt und getestet, um bakterielle Stämme mit AHL-Inaktivierung zu isolieren. Die bakterielle Mischung wurde in sterilisiertem Wasser durch Schütteln für 1 Stunde suspendiert, bevor sie auf YEB-Medium-Platten verteilt wurde (Hefeextrakt: 5 g/l; Caseinhydrolysat: 10 g/l; NaCl: 5 g/l; Saccharose: 5 g/l; $MgSO_4 \times 7H_2O$: 0,5 g/l und Agar: 15 g/l). Einzelne Kolonien wurden wieder auf neue Platten ausgestrichen, um die Reinheit der Isolate sicherzustellen. Die bakteriellen Isolate wurden in LB-Medium (Trypton: 10 g/l; Hefeextrakt: 5 g/l und NaCl: 10 g/l; pH 7,0) in 1,5 ml Eppendorf™-Röhrchen oder in Platten mit 96 Vertiefungen bei 28°C unter Schütteln über Nacht kultiviert und hinsichtlich einer AHL-Inaktivierungsaktivität getestet.

Beispiel 2. AHL-Inaktivierungsbiotest.

[0043] Die zu testende, bakterielle Kultur wurde mit einem gleichen Volumen von frischem Medium gemischt, welches 20 μM N- β -Oxooctanoyl-L-homoserinlacton (OOHL) oder ein anderes AHL, wenn dies angegeben ist, enthielt, um eine Reaktionsmischung herzustellen. Die Reaktionsmischung wurde bei 28°C für 4 bis 5 Stunden inkubiert und anschließend unter UV-Licht für 30 Minuten sterilisiert. Es wurden Platten mit 20 ml MM Agar-Medium hergestellt (K_2HPO_4 : 10,5 g/l; KH_2PO_4 : 4,5 g/l; $MgSO_4 \times 7H_2O$: 0,2 g/l; $FeSO_4$: 4,5 mg/l; $CaCl_2$: 10 mg/l; $MnCl_2$: 2 mg/l; $(NH_4)_2SO_4$: 2,0 g/l; Mannit: 2,0 g/l; pH 7,0), ergänzt mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal, 40 $\mu g/ml$). Das verfestigte Medium wurde noch in der Platte in getrennte Scheiben (etwa 1 cm Breite) geschnitten. Siehe die **Fig. 1**. Fünf Mikroliter sterilisierte Reaktionsmischung wurden von oben auf den MM-Agarstreifen aufgetragen und dann wurden 0,7 μl einer Zellsuspension von AHL-Indikatorzellen (*Agrobacterium tumefaciens* Stamm NT1 (traR; tra::lacZ749) (25), mit einer optischen Dichte von 0,4 bei 600 nm) mit zunehmend größeren Abständen von den beladenen Proben aufgetragen. Die Platten wurden bei 28°C für 24 Stunden inkubiert. Ein positives Ergebnis für eine AHL-Inaktivierung wird durch die Abwesenheit von blauen Kolonien auf der Scheibe dargestellt. Ein negatives Ergebnis hinsichtlich einer AHL-Inaktivierung wird durch die Gegenwart von blauen Kolonien auf der Scheibe gezeigt. Für den Proteintest auf Enzymaktivität wurde das lösliche, bakterielle Gesamtprotein mit 20 μM von OOHL (oder einem anderen AHL) bei 37°C für 1 Stunde als Reaktionsmischung inkubiert.

Beispiel 3. Identifizierung und Klonierung des qsbA-Gens.

[0044] Zwei bakterielle Isolate von der Biofilmprobe mit unterschiedlichen Phänotypen, XJ12B und XJ12A, wurden gefunden, welche die Fähigkeit zur Inaktivierung von AHL besaßen, wobei XJ12B die stärkere Enzymaktivität zeigte. Das XJ12B-Isolat wurde kultiviert, zentrifugiert und beschallt.

[0045] Die stärkste Enzymaktivität war eher mit der Fraktion der Zellreste als mit den löslichen Protein- und Überstandfraktionen assoziiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die AHL-Inaktivierungsaktivität Membran-assoziiert ist. Die Sequenzierung von 16S rRNA wurde durchgeführt, um die XJ12A- und XJ12B-Isolate zu identifizieren. Die 16S rRNA Sequenzen von diesen Isolaten zeigten eine 97 % bzw. 96 % Identität mit den Sequenzen von *Ralstonia eutropha*.

[0046] Um das Gen, welches für die AHL-Inaktivierung codiert, zu identifizieren, wurde eine Cosmidbibliothek von 1.600 Klonen in *E. coli* mit der genomischen DNA von *Ralstonia* sp. Stamm XJ12B hergestellt. Die genomische DNA von dem isolierten *Ralstonia* sp. Stamm XJ12B wurde mit Sau3A teilweise verdaut. Die erzielten DNA-Fragmente wurden mit der dephosphorylierten BamH1 Seite des Cosmidvektors pLAFR3 (28) ligiert. Die ligierte DNA wurde mit Gigapack III XL Packaging Extract (Stratagene) verpackt und in *E. coli* DH5alpha transfiziert. Diese *E. coli* Transfektanten wurden auf AHL-Inaktivierungsenergie gemäß den Verfahren, die im Beispiel 2 beschrieben sind, und unter Verwendung von OOHL als Substrat überprüft. Nur ein einzelner Klon (p13H10) wurde mit einer AHL-Inaktivierungsaktivität identifiziert (siehe **Fig. 1A**, Scheibe 1). Um das Gen, welches die nachgewiesene Aktivität codiert, subklonieren zu können, wurde die Cosmid-DNA von dem positiven Klon p13H10 teilweise mit Sau3A verdaut und in den mit BamH1 geschnittenen Klonierungsvektor pGEM-3Zf (+) eingebracht. Die Plasmide wurde ligiert und in *E. coli* transformiert und die *E. coli* wurden hinsichtlich ihrer

Fähigkeit zur Inaktivierung von AHL, wie im Beispiel 2 beschrieben, getestet. Der Klon p2B10, der ein 4 kb Insert enthielt, hatte die AHL-Inaktivierungsaktivität (siehe [Fig. 1A](#), Scheibe 2). Das TGS™ Template Generation System F-700 (Finnzymes OY) wurde verwendet, um die p2B10 Plasmid-DNA durch den zufälligen Einbau des artifiziellen Mu-Transposons zu mutieren gemäß den Anweisungen des Herstellers. Der Plasmidklon p2B10, der das 4 kb Insert mit dem qsbA-Gen enthielt, wurde als Matrize verwendet. 15 mutierte Klone wurden hergestellt und keiner war in der Lage, AHL zu inaktivieren. Die bakteriellen Kulturen von *E. coli* DH5 α , die pMUG3 und pMUC6 enthielten, sind als Beispiele in der [Fig. 1A](#), Scheiben 3 und 4, gezeigt. Die Plasmide wurden anschließend für die Sequenzierung gereinigt, wobei die Primer, die dem Kit beiliegen, verwendet wurden.

Beispiel 4. Sequenzierung und Sequenzanalyse des qsbA-Gens.

[0047] Die Sequenzierung wurde gemäß bekannten Verfahren unter Verwendung von des ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Eimer Applied Biosystems) durchgeführt. Das 4 kb Fragment von dem Klon p2B10 wurde vollständig sequenziert und ist in der Tabelle I dargestellt. Die Sequenz enthält einen offenen Leserahmen von 2.385 Nukleotiden mit einem ATG Startcodon und einem TGA Stoppcodon (SEQ ID Nr. 1, Nukleotide 1259-3643). Basierend auf der MU-Transposonmutagenesedaten, die im Beispiel 3 beschrieben sind, ist dieser offene Leserahmen die codierende Region des AHL-Inaktivierungsgens, welches als qsbA bezeichnet wurde. Eine mutmaßliche Ribosomenbindungsstelle (AGGAGA) ist sechs Basenpaare stromauf von dem ersten ATG Startcodon (in der Tabelle I unterstrichen) angeordnet.

[0048] Die abgeleitete Peptidsequenz zeigt die typische primäre Polypeptidstruktur von Aculeacin A Acylasen (AACs) und Penicillin G Acylasen mit einer Signalpeptid- α Untereinheit-Spacer- β Untereinheit-Organisation (16, 30). Es gibt vier zusätzliche, mögliche Startcodons, die bei 3, 36, 189 und 384 stromabwärts von dem ersten ATG angeordnet sind. Der längste offene Leserahmen codiert für 794 Aminosäuren mit einem vermuteten Molekulargewicht von 85.373 Daltons. Das abgeleitete Peptid hat 78 stark basische und stark saure Aminosäurereste und einen angenommenen isoelektrischen Punkt von 7,48. Die ersten 20 Aminosäurereste des angenommenen offenen Leserahmens scheinen ein Signalpeptid zu sein.

[0049] Die von dem offenen Leserahmen abgeleitete Peptidsequenz von qsbA ist zu 40–52 % identisch mit den AACs von *Deinococcus radiodurans* Stamm R1, *Actinoplanes utahensis* und einer mutmaßlichen Acylase aus *Pseudomonas aeruginosa*. Die AACs' katalysieren die Deacylierung ihrer Substrate. Diese AAC-Gene werden als ein einzelnes Vorläufer-Polypeptid translatiert und dann in die aktive Form von zwei Untereinheiten verarbeitet. Durch Ausrichtung mit den Peptidsequenzen von *D. radiodurans* Stamm R1, *A. utahensis* und *P. aeruginosa*, Tabelle II, wurden die angenommenen α - und β -Untereinheiten an den Aminopositionen 36-217 und 233-794 mit einem dazwischen liegenden 15 Aminosäure-Spacer lokalisiert. QsbA teilt sich weniger als 28 % Homologie mit der Penicillin G Acylase (20) und mit der Cephalosporin-Acylase (21). Siehe Tabelle II. Die Ausrichtung der Aminosäuresequenz in der Tabelle II wurde mit dem Clustal W Programm analysiert, das verfügbar ist von der European Bioinformatics Institute website (<http://www.ebi.ac.uk>).

Beispiel 5. Expression des QsbA-Gens.

[0050] Die codierende Region des qsbA-Gens wurde mittels PCR amplifiziert unter Verwendung eines Vorwärts-Primer 5'-CGTGGATCCATGATGCAGGATTCGCCGCTGCGC-3' (SEQ ID Nr. 6) und eines Rückwärts-Primer 5'-CGCGAATTCACCGGCAGCCCTCATGCGACAAC-3' (SEQ ID Nr. 7), welche die BamH1 und EcoR1 Restriktionsstellen enthalten. Die amplifizierten PCR Produkte wurden unter Verwendung der obigen Restriktionsenzyme geschnitten und im Leserahmen an die codierende Sequenz des Glutathion S Transferase (GST) Gens unter der Kontrolle des durch Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbaren lac Promotors im Vektor pGEX-2T (Amersham Pharmacia) fusioniert, um das Konstrukt pGST-QsbA zu erzeugen. pGST-QsbA wurde in *E. coli* transformiert und exprimiert.

[0051] Das lösliche Gesamtprotein wurde aus den rekombinanten *E. coli* Zellen, welche das GST-QsbA codierende Fusionskonstrukt aufwies, gemäß im Stand der Technik bekannten Verfahren und basierend auf den Verfahren, die in Dong et al. (9) beschrieben sind, extrahiert und hinsichtlich einer AHL-Inaktivierung getestet. Das lösliche Gesamtprotein von *E. coli*, das nur den GST-Vektor enthielt, wurde als Kontrolle verwendet. Für den Biotest wurden 50 μ l der löslichen Proteinpräparation (20 μ g/ μ l) zu dem gleichen Volumen von 40 μ M AHL, zum Beispiel OOHL, zugegeben. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 37°C wurde die Reaktionsmischung getestet, wie dies im Beispiel 2 beschrieben ist. Repräsentative Daten, die in der [Fig. 1B](#), Scheibe 1, dargestellt sind, zeigen, dass das lösliche GST-QsbA Fusionsprotein die OOHL-Aktivität effektiv eliminiert.

Beispiel 6. Charakterisierung des Substratspektrums des GST-QsbA Fusionsproteins, exprimiert in *E. coli*.

[0052] Um das Substratspektrum von QsbA zu bestimmen, wurde das lösliche Gesamtprotein von dem rekombinanten *E. coli* (pGST-QsbA) hinsichtlich der Inaktivierung von AHLs mit Acylketten von unterschiedlichen Längen gemäß den Verfahren des Beispiels 2 getestet. Die folgenden AHLs wurden gemäß bekannten Verfahren synthetisiert, wie dies beschrieben ist von Zhang et al. (31): (1) N-Octanoyl-L-homoserinlacton (C8HSL, OOHL); (2) N-Decanoyl-L-homoserinlacton (C10HSL, DHL); (3) N-β-Oxohexanoyl-L-homoserinlacton (3-oxo-C6HSL, OHHL); (4) N-β-Oxohexanoyl-L-homoserinlacton (3-oxo-C12HSL, OdDHL); (5) N-β-Oxohexanoyl-L-homoserinlacton (3-oxo-C8HSL, OOHL). Die Butyl- und Hexylester von N-β-Oxohexanoyl-L-homoserin wurden durch Veresterung von N-β-Oxohexanoyl-L-homoserinlacton mit 1-Butanol bzw. 1-Hexanol in Gegenwart einer geringen Menge von Dowex 50H+ Harz (Aldrich) hergestellt. Die Reaktion wurde bei 60°C für 2 Stunden durchgeführt und die Produkte wurden durch Kieselgelsäulenchromatographie gereinigt.

[0053] QsbA inaktivierte vollständig OOHL, N-β-Oxodecanoyl-L-homoserin (ODHL) und N-β-Oxododecanoyl-L-homoserin (OdDHL), die Acylketten von 8, 10 und 12 Kohlenstoffatomen aufweisen, bei den getesteten Konzentrationen (Daten nicht gezeigt). QsbA inaktivierte stark N-β-Octanoyl-L-homoserin (OHL) und N-β-Decanoyl-L-homoserin (DHL), die 8 bzw. 10 Kohlenstoffatome aufweisen (Daten nicht gezeigt). Unter den gleichen Reaktionsbedingungen hatte QsbA je doch eine geringere Inaktivierungsaktivität für N-β-Oxohexanoyl-L-homoserin (OHHL), das eine Acylkette von 6 Kohlenstoffatomen aufweist (Daten nicht gezeigt). Der lösliche Gesamtproteinextrakt aus der Kontrolle *E. coli* (pGST) zeigte keine Aktivität gegen die AHLs (Daten nicht gezeigt).

[0054] QsbA inaktivierte auch vollständig die Butyl- und Hexylester von N-β-Octanoyl-L-homoserin (Daten nicht gezeigt). Diese zwei Ester von N-β-Octanoyl-L-homoserin zeigten eine vergleichbare Induktionsaktivität mit OOHL, wenn sie mit dem AHL Reporterstamm *A. tumefaciens* NT1 (traR; tra::lacZ749) (Daten nicht gezeigt) getestet wurden. AHL-Lactonase (codiert durch *aiiA*) inaktivierte diese Substrate nicht. Diese Daten der Substratspezifität sind konsistent mit der Identifizierung von QsbA als eine AHL-Acylase.

Beispiel 7. Reinigung der durch das *qsba* Gen codierten AHL-Acylase.

[0055] Das GST-[AHL-Acylase] Fusionsprotein wurde unter Verwendung einer Glutathion-Sepharose-4B Affinitätssäule gemäß den Anweisungen des Herstellers (Pharmacia) gereinigt. Die AHL-Acylase wurde durch Verdau mit Thrombin (Sigma) geschnitten. Die Proteinkonzentration wurde durch Messung bei OD₂₈₀ bestimmt.

[0056] Die gereinigte AHL-Acylase wurde mit OOHL für 20 Minuten inkubiert und die relative Enzymaktivität wurde durch Bestimmung des restlichen OOHL in der Reaktionsmischung gemessen, die 8 μM OOHL und etwa 0,6 μg AHL-Acylase in einem Gesamtreaktionsvolumen von 50 ml 1 × PBS Puffer enthielt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1 % SDS gestoppt, bevor sie auf die Testplatten geladen wurden. Die Bestimmung der OOHL-Aktivität wurde in vierfacher Ausfertigung durchgeführt. AHL-Acylase baute OOHL in einem Temperaturbereich von 22–42°C bei einem pH von 7,0 ab. Siehe **Fig. 2**. Die optimale Temperatur für die Enzymaktivität wurde bei etwa 28°C gefunden. Eine Reaktionstemperatur von mehr als 42°C führte zu einem starken Abfall der Enzymaktivität. Der optimale pH für die Enzymaktivität wurde auch bestimmt. Die AHL-Acylasen haben einen relativ engen, optimalen pH-Bereich von pH 6,0 bis 7,5. Siehe **Fig. 2**. Der Zeitverlauf der OOHL-Inaktivierung durch die gereinigte AHL-Acylase wurde bei 30°C bestimmt. Siehe **Fig. 3**. Nach 10 Minuten waren mehr als 82 % OOHL abgebaut. Die Reaktionsrate wurde zu etwa 55 pMole pro μg AHL-Acylase pro Minute bestimmt.

Sequenzliste

<110> Zhang, Lian Hui
 Lin, Yi Han
 Xu, Jin Ling

<120> RALSTONIA AHL-ACYLASE GEN

<130> 2577-154 PCT

<160> 7

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 3743

<212> DNA

<213> Ralstonia sp.

<220>

<221> N_Region

<222> (16)..(16)

<223> unbekannt

<400> 1

```

gtttgggaaa gtgggnagcg cgctgtgcag cgccccgccc ctgagccgcg cagctcggcg      60
cgcaccgaat gcgcgcgccg gtgggcgccc ggcggctggc cgggtgtggcg ccggatcagg      120
cgccggaagg cggacatgtc gtgataaccg cactgttcgg cgattgccgt caggctcagc      180
gtgctgactt ccagcaggtg gcaggcgcgc tccacgcgca gccggtgcag caattgcagc      240

```

ggcgaggtgc ccagggctctt ggtgaaatgc cgcagcagcg tgcgctcget ggtcgaggcg	300
gcggcgccca gcttggccag gtcgaacggc tcgtgcaggt gctgctgcag gtagcgccgc	360
gcccgcagta ccacgctggt gcggatggcg ggcttgetgc gcagccagat ggcggtggac	420
tcaccgcgcg acgggtggtc gagcacggcc tggccgaggg tgcgtgccag ccgggtgtcg	480
gccaggcggc cgaccaggcg ctgctgagc gccacgccgt gctccatcgc gcgcgccgtc	540
agcacgttgc cgctgctgac gatggcctgc tccgccacca ccttcagctg cgggtagtgtg	600
ccgtgcagcc agccggcgat cagccacgtc accgtcaagc gccggccggc gggcagcgcg	660
ccggccagca gcgccacgcc ggtgaaggac gaggccacca agcctgccgg cgtccaggta	720
gcgccggatg gtggcgctt cccactccag cagggccagg cgctgctcca gcgtgctgat	780
gtggtcgaaa tgcaggggcg ggacgaccag cgcgtcgccc agcgcggcgt cgcccgccgg	840
cagcggctgg cagcggcagg ccagggctctc ggcggcggcc tgccagcggg ccgggtcgcg	900
cgcgaccagc cgccaccgca acaccgggct ggcggcatcg gcacgcttgc cggcatgcat	960
ggaggcgagc gcattggcca cgccgagggg gtcggcgacg gtcgccagcg tggagaggcc	1020
ggcgtcggga aaggtcagca ggtcgatgtc ggcatccgca aagtataggg gaggcgggcg	1080
gaggctcct gcgtggcggg attgaccca actctggcgg gaatacctct ttctccggg	1140
cgggccccag tcgacgatac ggcggtggct gcgcctgcgc gccgccgcaa gactagagcg	1200
acacaagaca agaccgaca caggagaca cgcatgatgc agggattcgc gctgcgcggc	1260
acgctcgcca tggccgcgct cgcggcgctg gccggtgcg ccagttccac cgatggccgc	1320
tgggggtcgc tcagcgacac cggcctgtcc gccgagatcc gccgcaccgg cttcggcatt	1380
ccgcacatcc gcgccaacga ctacgccagc ctcggtatg gcatggccta tgcttacgcg	1440
caggacaacc tgtgcctgct ggccgaccag gtggtcaccg tcaacggcga gcgctcgaag	1500
accttcgggc ccgagggcac cgtgacggtc tcgttcaagc cgatccccaa cctgcagtcg	1560
gacgccttct tcaagggcat cttcgacgag gacggcctgc gcgccggtta tgcgcagatg	1620
tcgcccgagg cgcgcgagct gctgcgcggc tacatcgccg gcttcaaccg ctatctcaag	1680
gacacgccgc ccgccaactt cccggccgcc tgccgcaatg ccgcctgggt gcgtccgctc	1740
acgtgggcg acatgatgcg catgggcgaa gagaaggcga tccaggccag cgccggcgcc	1800
atgctggcgg gcatcgtcgc cgcgcagccg ccgggccgca cgccggtggc cgagcgcgag	1860
attccgcgc aggcgctcga caccgtggcg ctggaccgcg aactgcagct gcgcgacatg	1920
ccgatcggct ccaacggctg ggccttcggc gctgacgcca ccgccaaccg gcgcggcgtg	1980

ctgctcggca atccgcactt cccgtggacg accaccaacc gcttctacca ggtccacctg	2040
acggtgcccc gcaagctcga cgtgatgggc gcctcgatcg cggccttccc ggtgggtgagc	2100
atcggcttca acaaggacgt ggcgtggacg cacaccgtct ccaccggccg ccgcttcacc	2160
ttgttcgaac tgaagctggc cgaaggcgac cggaccacct acctggtcga cggcacgccc	2220
cacaagatga ccaccgcac ggtcgccttc gacgtcaagc tgccggacgg ccgcctcgag	2280
cgccgcacgc acaccttcta cgacaccatc tacggcccgg tgctgtcgat gccgagcggc	2340
ggcatgccgt ggaccacgca gaaggcctac gccctgcgcg acgccaaccg caacaacacg	2400
cgctcggctg acagctggct gcatatcggg caggcccggg acgtggccgg catccgccag	2460
gccatcggca acctgggcat tcctgggtc aacaccatcg ccaccgaccg caacggccgc	2520
gcgctgttcg ccgacgtgtc gaccacgccg gacgtgccgg ccgaggagct ccagcgctgt	2580
gccccgtcgc cgctggccgg caaactcttc aaggacgcgg gcctgggtgct gctcgacggc	2640
tcgcgcgga cctgcaactg gcaggtcgat ccggcttcgc cggtaaccgg gctgggtggcg	2700
cccgcgcgca tgccgggtgct cgagcgcgac gactacgtcg ccaacagcaa tgacagctcc	2760
tggtgacca accccgcgca aaagctgacc ggcttctcgc cggtgatggg ctcggtcgac	2820
gtaccgcagc ggctgcgcac gcgcatcggc ctgatcgaga tcggccgccc cctggccggc	2880
accgacggac tgcccggcaa ccgcatcgat ctgccgaacc tgcaggcgat gatcttcagc	2940
aatgccaaac tggcgggaca actggtgctg ggcgacctgc tcgcgccatg caaggccacg	3000
ccggccccgg atgccgacgt gcgcgacggc tgcgcccgcc tcggccagtg gaaccgcacc	3060
agcaacgccg acgcccgcgc cgcgcacctg ttccgcgagt tctggatgeg cgccaaggac	3120
atcgcgcagg tgcaacccgt cgagttcgac ccggccgacc cggtcacac gccgcgcggc	3180
ctgcgcatga acgacgcgac ggtacgcacg gcggtgttca aggcgctgaa ggaagccgtg	3240
ggcgcggtgc gcaaggcggg cttcgcgctg gatgcgcccg tgggcaaggc acaggccgcg	3300
cacgcaccgg acggctccat cgccctgcac ggcggcgagg aatacgaagg cgtgctcaac	3360
aagctgcaaa ccctgcccgat cgggccgaag gggctgccgg tgtatttcgg caccagctac	3420
atccagaccg tgaccttcga cgaccagggc ccggtcgcgg acgccatcct cacctacggc	3480
gaatcgaccg accacgcctc gccgcacgcg ttcgaccaga tgcggtcgta ctcgggcaag	3540
cactggaacc ggctgccgtt ctccgaagcg gccatcgcgg ccgatccggc gctgaagggtg	3600
atgcggttgt cgcagtgagg gctgccggtg cctggaaaaa cgccccgctt gtgcggggcg	3660
tttttttgcc agtgtgaatg gctcaatcgt gttggaaacc gcatccggac atgactgtat	3720

tgtgactctg cctgtgtccg tgt

3743

<210> 2

<211> 794

<212> PRT

<213> Ralstonia sp.

<400> 2

Met Met Gln Gly Phe Ala Leu Arg Gly Thr Leu Ala Met Ala Ala Leu
1 5 10 15

Ala Ala Leu Ala Gly Cys Ala Ser Ser Thr Asp Gly Arg Trp Gly Ser
20 25 30

Leu Ser Asp Thr Gly Leu Ser Ala Glu Ile Arg Arg Thr Gly Phe Gly
35 40 45

Ile Pro His Ile Arg Ala Asn Asp Tyr Ala Ser Leu Gly Tyr Gly Met
50 55 60

Ala Tyr Ala Tyr Ala Gln Asp Asn Leu Cys Leu Leu Ala Asp Gln Val
65 70 75 80

Val Thr Val Asn Gly Glu Arg Ser Lys Thr Phe Gly Pro Glu Gly Thr
85 90 95

Val Thr Val Ser Phe Lys Pro Ile Pro Asn Leu Gln Ser Asp Ala Phe
100 105 110

Phe Lys Gly Ile Phe Asp Glu Asp Gly Leu Arg Ala Gly Tyr Ala Gln
115 120 125

Met Ser Pro Glu Ala Arg Glu Leu Leu Arg Gly Tyr Ile Ala Gly Phe
130 135 140

Asn Arg Tyr Leu Lys Asp Thr Pro Pro Ala Asn Phe Pro Ala Ala Cys
145 150 155 160

Arg Asn Ala Ala Trp Val Arg Pro Leu Thr Leu Gly Asp Met Met Arg
165 170 175

Met Gly Glu Glu Lys Ala Ile Gln Ala Ser Ala Gly Ala Met Leu Ala
180 185 190

Gly Ile Val Ala Ala Gln Pro Pro Gly Arg Thr Pro Val Ala Glu Arg
195 200 205

Glu Ile Pro Pro Gln Ala Val Asp Thr Val Ala Leu Asp Arg Glu Leu
210 215 220

Gln Leu Arg Asp Met Pro Ile Gly Ser Asn Gly Trp Ala Phe Gly Ala
 225 230 235 240
 Asp Ala Thr Ala Asn Arg Arg Gly Val Leu Leu Gly Asn Pro His Phe
 245 250 255
 Pro Trp Thr Thr Thr Asn Arg Phe Tyr Gln Val His Leu Thr Val Pro
 260 265 270
 Gly Lys Leu Asp Val Met Gly Ala Ser Ile Ala Ala Phe Pro Val Val
 275 280 285
 Ser Ile Gly Phe Asn Lys Asp Val Ala Trp Thr His Thr Val Ser Thr
 290 295 300
 Gly Arg Arg Phe Thr Leu Phe Glu Leu Lys Leu Ala Glu Gly Asp Pro
 305 310 315 320
 Thr Thr Tyr Leu Val Asp Gly Thr Pro His Lys Met Thr Thr Arg Thr
 325 330 335
 Val Ala Phe Asp Val Lys Leu Pro Asp Gly Arg Leu Glu Arg Arg Thr
 340 345 350
 His Thr Phe Tyr Asp Thr Ile Tyr Gly Pro Val Leu Ser Met Pro Ser
 355 360 365
 Gly Gly Met Pro Trp Thr Thr Gln Lys Ala Tyr Ala Leu Arg Asp Ala
 370 375 380
 Asn Arg Asn Asn Thr Arg Ser Val Asp Ser Trp Leu His Ile Gly Gln
 385 390 395 400
 Ala Arg Asp Val Ala Gly Ile Arg Gln Ala Ile Gly Asn Leu Gly Ile
 405 410 415
 Pro Trp Val Asn Thr Ile Ala Thr Asp Arg Asn Gly Arg Ala Leu Phe
 420 425 430
 Ala Asp Val Ser Thr Thr Pro Asp Val Pro Ala Ala Glu Leu Gln Arg
 435 440 445
 Cys Ala Pro Ser Pro Leu Ala Gly Lys Leu Phe Lys Asp Ala Gly Leu
 450 455 460
 Val Leu Leu Asp Gly Ser Arg Gly Thr Cys Asn Trp Gln Val Asp Pro
 465 470 475 480
 Ala Ser Pro Val Pro Gly Leu Val Ala Pro Ala Arg Met Pro Val Leu
 485 490 495
 Glu Arg Asp Asp Tyr Val Ala Asn Ser Asn Asp Ser Ser Trp Leu Thr
 500 505 510
 Asn Pro Ala Gln Lys Leu Thr Gly Phe Ser Pro Val Met Gly Ser Val
 515 520 525

Asp Val Pro Gln Arg Leu Arg Thr Arg Ile Gly Leu Ile Glu Ile Gly
 530 535 540
 Arg Arg Leu Ala Gly Thr Asp Gly Leu Pro Gly Asn Arg Ile Asp Leu
 545 550 555 560
 Pro Asn Leu Gln Ala Met Ile Phe Ser Asn Ala Asn Leu Ala Gly Gln
 565 570 575
 Leu Val Leu Gly Asp Leu Leu Ala Ala Cys Lys Ala Thr Pro Ala Pro
 580 585 590
 Asp Ala Asp Val Arg Asp Gly Cys Ala Ala Leu Gly Gln Trp Asn Arg
 595 600 605
 Thr Ser Asn Ala Asp Ala Arg Ala Ala His Leu Phe Arg Glu Phe Trp
 610 615 620
 Met Arg Ala Lys Asp Ile Ala Gln Val His Ala Val Glu Phe Asp Pro
 625 630 635 640
 Ala Asp Pro Val His Thr Pro Arg Gly Leu Arg Met Asn Asp Ala Thr
 645 650 655
 Val Arg Thr Ala Val Phe Lys Ala Leu Lys Glu Ala Val Gly Ala Val
 660 665 670
 Arg Lys Ala Gly Phe Ala Leu Asp Ala Pro Leu Gly Thr Val Gln Ala
 675 680 685
 Ala His Ala Pro Asp Gly Ser Ile Ala Leu His Gly Gly Glu Glu Tyr
 690 695 700
 Glu Gly Val Leu Asn Lys Leu Gln Thr Leu Pro Ile Gly Pro Lys Gly
 705 710 715 720
 Leu Pro Val Tyr Phe Gly Thr Ser Tyr Ile Gln Thr Val Thr Phe Asp
 725 730 735
 Asp Gln Gly Pro Val Ala Asp Ala Ile Leu Thr Tyr Gly Glu Ser Thr
 740 745 750
 Asp His Ala Ser Pro His Ala Phe Asp Gln Met Arg Ala Tyr Ser Gly
 755 760 765
 Lys His Trp Asn Arg Leu Pro Phe Ser Glu Ala Ala Ile Ala Ala Asp
 770 775 780
 Pro Ala Leu Lys Val Met Arg Leu Ser Gln
 785 790

<210> 3

<211> 785

<212> PRT

<213> D. radiodurans

<400> 3

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

Gly Leu Leu Leu Gly Asn Pro His Phe Pro Trp Glu Thr Ser Asn Arg
 245 250 255
 Phe Tyr Gln Leu His Leu Thr Leu Pro Gly Gln Phe Asp Val Met Gly
 260 265 270
 Ala Ser Leu Gly Gly Met Pro Val Val Asn Ile Gly Phe Asn Gln Asp
 275 280 285
 Val Ala Trp Thr His Thr Val Ser Thr Asp Lys Arg Phe Thr Leu Ala
 290 295 300
 Ala Leu Thr Leu Val Pro Gly Asp Pro Leu Ser Tyr Val Lys Asp Gly
 305 310 315 320
 Gln Gln Arg Arg Leu Gln Arg Arg Thr Ala Val Ile Glu Val Lys Thr
 325 330 335
 Ala Asn Gly Pro Arg Leu His Thr Arg Thr Val Tyr Phe Thr Pro Glu
 340 345 350
 Gly Pro Leu Val Asn Leu Pro Ala Ala Gly Leu Thr Trp Thr Pro Gln
 355 360 365
 Tyr Ala Phe Ala Leu Arg Asp Ala Asn Arg Asn Asn Thr Arg Met Leu
 370 375 380
 Ala Thr Trp Leu Gly Phe Ala Gly Ala Lys Ser Val Arg Asp Ile Arg
 385 390 395 400
 Ala Ser Leu Asn Val Gln Gly Ile Pro Trp Val Asn Thr Ile Ala Ala
 405 410 415
 Asp Arg Ala Gly Ser Ala Leu Tyr Ala Asp Ile Ser Ser Ser Pro Asn
 420 425 430
 Val Ser Ala Ala Gln Gln Gln Ala Cys Thr Pro Pro Pro Leu Ala Pro
 435 440 445
 Leu Phe Pro Ala Ala Gly Leu Ala Val Leu Asp Gly Ser His Ser Ala
 450 455 460
 Cys Asp Trp Lys Thr Asp Pro Ala Ser Arg Val Pro Gly Leu Arg Ala
 465 470 475 480
 Pro Asp Lys Met Pro Val Leu Ile Arg Gln Asp Phe Val Ala Asn Ser
 485 490 495
 Asn Asn Ser Ala Trp Leu Ala Asn Pro Ala Ala Pro Gln Thr Gly Leu
 500 505 510
 Asp Pro Leu Val Gly Glu Val Asn Ala Pro Gln Ser Pro Arg Thr Arg
 515 520 525
 Met Gly Leu Leu Glu Ile Gly Arg Arg Leu Ser Gly Thr Asp Gly Leu
 530 535 540

Pro Gly Arg Thr Phe Asp Ile Pro Thr Leu Gln Ala Thr Leu Leu Arg
 545 550 555 560
 Glu Ser Asn Leu Thr Gly Glu Met Tyr Ala Ala Asp Ala Ala Lys Leu
 565 570 575
 Cys Gln Ser Ala Gly Gly Ala Glu Leu Gln Pro Ala Cys Asn Ala Leu
 580 585 590
 Ala Ala Trp Asp Arg Arg Ser Ser Gln Glu Ser Arg Gly Ala Ala Leu
 595 600 605
 Trp Arg Glu Phe Trp Arg Arg Ala Arg Ala Ile Pro Asn Val Tyr Ala
 610 615 620
 Val Pro Phe Asp Pro Ala Asp Pro Val Asn Thr Pro Arg Gly Leu Asn
 625 630 635 640
 Thr Ala Asp Pro Ala Ala Gln Thr Ala Leu Leu Gly Ala Leu Arg Glu
 645 650 655
 Ala Ala Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gly Ile Pro Phe Asp Ala Pro Leu
 660 665 670
 Gly Glu Val Gln Gly Val Val Arg Gly Gly Asp Phe Ile Ser Leu Pro
 675 680 685
 Gly Gly Ala Glu Phe Glu Gly Val Leu Asp Lys Ile Asp Phe Asn Pro
 690 695 700
 Leu Ala Pro Gly Gly Tyr Arg Gly Val Val Gly Asn Ala Ser Ser Tyr
 705 710 715 720
 Ile Gln Thr Val Gly Phe Thr Asp Ser Gly Val Gln Ala Glu Ala Val
 725 730 735
 Leu Thr Tyr Ser Gln Ser Ser Asn Pro Glu Ser Pro Tyr Phe Ser Asp
 740 745 750
 Gln Thr Arg Leu Phe Ser Arg Ser Glu Trp Val Lys Leu Pro Phe Thr
 755 760 765
 Gln Pro Glu Ile Glu Ala Asp Pro Thr Arg Thr Val Val Gln Leu Ser
 770 775 780
 Glu
 785

<210> 4

<211> 786

<212> PRT

<213> A. utahensis

<400> 4

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

Val Asn Gly Ser Gly Met Val Leu Ala Asn Pro His Phe Pro Trp Gln
 245 250 255
 Gly Ala Glu Arg Phe Tyr Arg Met His Leu Lys Val Pro Gly Arg Tyr
 260 265 270
 Asp Val Glu Gly Ala Ala Leu Ile Gly Asp Pro Ile Ile Glu Ile Gly
 275 280 285
 His Asn Arg Thr Val Ala Trp Ser His Thr Val Ser Thr Ala Arg Arg
 290 295 300
 Phe Val Trp His Arg Leu Ser Leu Val Pro Gly Asp Pro Thr Ser Tyr
 305 310 315 320
 Tyr Val Asp Gly Arg Pro Glu Arg Met Arg Ala Arg Thr Val Thr Val
 325 330 335
 Gln Thr Gly Ser Gly Pro Val Ser Arg Thr Phe His Asp Thr Arg Tyr
 340 345 350
 Gly Pro Val Ala Val Val Pro Gly Thr Phe Asp Trp Thr Pro Ala Thr
 355 360 365
 Ala Tyr Ala Ile Thr Asp Val Asn Ala Gly Asn Asn Arg Ala Phe Asp
 370 375 380
 Gly Trp Leu Arg Met Gly Gln Ala Lys Asp Val Arg Ala Leu Lys Ala
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Arg His Gln Phe Leu Pro Trp Val Asn Val Ile Ala Ala
 405 410 415
 Asp Ala Arg Gly Glu Ala Leu Tyr Gly Asp His Ser Val Val Pro Arg
 420 425 430
 Val Thr Gly Ala Leu Ala Ala Ala Cys Ile Pro Ala Pro Phe Gln Pro
 435 440 445
 Leu Tyr Ala Ser Ser Gly Gln Ala Val Leu Asp Gly Ser Arg Ser Asp
 450 455 460
 Cys Ala Leu Gly Ala Asp Pro Asp Ala Ala Val Pro Gly Ile Leu Gly
 465 470 475 480
 Pro Ala Ser Leu Pro Val Arg Phe Arg Asp Asp Tyr Val Thr Asn Ser
 485 490 495
 Asn Asp Ser His Trp Leu Ala Ser Pro Ala Ala Pro Leu Glu Gly Phe
 500 505 510
 Pro Arg Ile Leu Gly Asn Glu Arg Thr Pro Arg Ser Leu Arg Thr Arg
 515 520 525
 Leu Gly Leu Asp Gln Ile Gln Gln Arg Leu Ala Gly Thr Asp Gly Leu
 530 535 540

Pro Gly Lys Gly Phe Thr Thr Ala Arg Leu Trp Gln Val Met Phe Gly
 545 550 555 560
 Asn Arg Met His Gly Ala Glu Leu Val Arg Asp Asp Leu Val Ala Leu
 565 570 575
 Cys Arg Arg Gln Pro Thr Ala Thr Ala Ser Asn Gly Ala Ile Val Asp
 580 585 590
 Leu Thr Ala Ala Cys Thr Ala Leu Ser Arg Phe Asp Glu Arg Ala Asp
 595 600 605
 Leu Asp Ser Arg Gly Ala His Leu Phe Thr Glu Phe Leu Ala Gly Gly
 610 615 620
 Ile Arg Phe Ala Asp Thr Phe Glu Val Thr Asp Pro Val Arg Thr Pro
 625 630 635 640
 Ala Pro Phe Trp Asn Thr Thr Asp Pro Arg Val Arg Thr Ala Leu Ala
 645 650 655
 Asp Ala Cys Asn Gly Ser Pro Ala Ser Pro Ser Thr Arg Ser Val Gly
 660 665 670
 Asp Ile His Thr Asp Ser Arg Gly Glu Arg Arg Ile Pro Ile His Gly
 675 680 685
 Gly Arg Gly Glu Ala Gly Thr Phe Asn Val Ile Thr Asn Pro Leu Val
 690 695 700
 Pro Gly Val Gly Tyr Pro Gln Val Val His Gly Thr Ser Phe Val Met
 705 710 715 720
 Ala Val Glu Leu Gly Pro His Gly Pro Ser Gly Arg Gln Ile Leu Thr
 725 730 735
 Tyr Ala Gln Ser Thr Asn Pro Asn Ser Pro Trp Tyr Ala Asp Gln Thr
 740 745 750
 Val Leu Tyr Ser Arg Lys Gly Trp Asp Thr Ile Lys Tyr Thr Glu Ala
 755 760 765
 Gln Ile Ala Ala Asp Pro Asn Leu Arg Val Tyr Arg Val Ala Gln Arg
 770 775 780
 Gly Arg
 785

<210> 5

<211> 777

<212> PRT

<213> *P. aeruginosa*

<400> 5

Met Ser Arg Pro Phe Arg Pro Pro Leu Cys Arg Glu Thr Thr Ser Met
1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Val Leu Thr Gly Leu Ala Gly Met Leu Leu Gly Ser
20 25 30

Met Met Pro Val Gln Ala Asp Met Pro Arg Pro Thr Gly Leu Ala Ala
35 40 45

Asp Ile Arg Trp Thr Ala Tyr Gly Val Pro His Ile Arg Ala Lys Asp
50 55 60

Glu Arg Gly Leu Gly Tyr Gly Ile Gly Tyr Ala Tyr Ala Arg Asp Asn
65 70 75 80

Ala Cys Leu Leu Ala Glu Glu Ile Val Thr Ala Arg Gly Glu Arg Ala
85 90 95

Arg Tyr Phe Gly Ser Glu Gly Lys Ser Ser Ala Glu Leu Asp Asn Leu
100 105 110

Pro Ser Asp Ile Phe Tyr Ala Trp Leu Asn Gln Pro Glu Ala Leu Gln
115 120 125

Ala Phe Trp Gln Ala Gln Thr Pro Ala Val Arg Gln Leu Leu Glu Gly
130 135 140

Tyr Ala Ala Gly Phe Asn Arg Phe Leu Arg Glu Ala Asp Gly Lys Thr
145 150 155 160

Thr Ser Cys Leu Gly Gln Pro Trp Leu Arg Ala Ile Ala Thr Asp Asp
165 170 175

Leu Leu Arg Leu Thr Arg Arg Leu Leu Val Glu Gly Gly Val Gly Gln
180 185 190

Phe Ala Asp Ala Leu Val Ala Ala Ala Pro Pro Gly Ala Glu Lys Val
195 200 205

Ala Leu Ser Gly Glu Gln Ala Phe Gln Val Ala Glu Gln Arg Arg Gln
210 215 220

Arg Phe Arg Leu Glu Arg Gly Ser Asn Ala Ile Ala Val Gly Ser Glu
225 230 235 240

Arg Ser Ala Asp Gly Lys Gly Met Leu Leu Ala Asn Pro His Phè Pro
 245 250 255
 Trp Asn Gly Ala Met Arg Phe Tyr Gln Met His Leu Thr Ile Pro Gly
 260 265 270
 Arg Leu Asp Val Met Gly Ala Ser Leu Pro Gly Leu Pro Val Val Asn
 275 280 285
 Ile Gly Phe Ser Arg His Leu Ala Trp Thr His Thr Val Asp Thr Ser
 290 295 300
 Ser His Phe Thr Leu Tyr Arg Leu Ala Leu Asp Pro Lys Asp Pro Arg
 305 310 315 320
 Arg Tyr Leu Val Asp Gly Arg Ser Leu Pro Leu Glu Glu Lys Ser Val
 325 330 335
 Ala Ile Glu Val Arg Gly Ala Asp Gly Lys Leu Ser Arg Val Glu His
 340 345 350
 Lys Val Tyr Gln Ser Ile Tyr Gly Pro Leu Val Val Trp Pro Gly Lys
 355 360 365
 Leu Asp Trp Asn Arg Ser Glu Ala Tyr Ala Leu Arg Asp Ala Asn Leu
 370 375 380
 Glu Asn Thr Arg Val Leu Gln Gln Trp Tyr Ser Ile Asn Gln Ala Ser
 385 390 395 400
 Asp Val Ala Asp Leu Arg Arg Arg Val Glu Ala Leu Gln Gly Ile Pro
 405 410 415
 Trp Val Asn Thr Leu Ala Ala Asp Glu Gln Gly Asn Ala Leu Tyr Met
 420 425 430
 Asn Gln Ser Val Val Pro Tyr Leu Lys Pro Glu Leu Ile Pro Ala Cys
 435 440 445
 Ala Ile Pro Gln Leu Val Ala Glu Gly Leu Pro Ala Leu Gln Gly Gln
 450 455 460
 Asp Ser Arg Cys Ala Trp Ser Arg Asp Pro Ala Ala Ala Gln Ala Gly
 465 470 475 480
 Ile Thr Pro Ala Ala Gln Leu Pro Val Leu Leu Arg Arg Asp Phe Val
 485 490 495
 Gln Asn Ser Asn Asp Ser Ala Trp Leu Thr Asn Pro Ala Ser Pro Leu
 500 505 510
 Gln Gly Phe Ser Pro Leu Val Ser Gln Glu Lys Pro Ile Gly Pro Arg
 515 520 525
 Ala Arg Tyr Ala Leu Ser Arg Leu Gln Gly Lys Gln Pro Leu Glu Ala
 530 535 540

Lys Thr Leu Glu Glu Met Val Thr Ala Asn His Val Phe Ser Ala Asp
 545 550 555 560
 Gln Val Leu Pro Asp Leu Leu Arg Leu Cys Arg Asp Asn Gln Gly Glu
 565 570 575
 Lys Ser Leu Ala Arg Ala Cys Ala Ala Leu Ala Gln Trp Asp Arg Gly
 580 585 590
 Ala Asn Leu Asp Ser Gly Ser Gly Phe Val Tyr Phe Gln Arg Phe Met
 595 600 605
 Gln Arg Phe Ala Glu Leu Asp Gly Ala Trp Lys Glu Pro Phe Asp Ala
 610 615 620
 Gln Arg Pro Leu Asp Thr Pro Gln Gly Ile Ala Leu Asp Arg Pro Gln
 625 630 635 640
 Val Ala Thr Gln Val Arg Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ala Ala Glu Val
 645 650 655
 Glu Lys Ser Gly Ile Pro Asp Gly Ala Arg Trp Gly Asp Leu Gln Val
 660 665 670
 Ser Thr Arg Gly Gln Glu Arg Ile Ala Ile Pro Gly Gly Asp Gly His
 675 680 685
 Phe Gly Val Tyr Asn Ala Ile Gln Ser Val Arg Lys Gly Asp His Leu
 690 695 700
 Glu Val Val Gly Gly Thr Ser Tyr Ile Gln Leu Val Thr Phe Pro Glu
 705 710 715 720
 Glu Gly Pro Lys Ala Arg Gly Leu Leu Ala Phe Ser Gln Ser Ser Asp
 725 730 735
 Pro Arg Ser Pro His Tyr Arg Asp Gln Thr Glu Leu Phe Ser Arg Gln
 740 745 750
 Gln Trp Gln Thr Leu Pro Phe Ser Asp Arg Gln Ile Asp Ala Asp Pro
 755 760 765
 Gln Leu Gln Arg Leu Ser Ile Arg Glu
 770 775

- <210> 6
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificielle Sequenz

<220>

<223> Vorwärtsprimer für das QsbA Gen

<400> 6
cgtggatcca tgatgcagga ttcgccgctg cgc

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> Artifizielle Sequenz

<220>

<223> Rückwärtsprimer für das QsbA Gen

<400> 7
cgcgaaatca ccggcagccc tcatgcgaca ac

Patentansprüche

1. Nukleinsäure gemäß SEQ ID Nr. 1.
2. Nukleinsäure, welche die Nukleotide 1234-3618 von SEQ ID Nr. 1 umfasst.
3. Peptid mit einer Sequenz, welche von einer Nukleinsäure codiert wird, die aus den Nukleotiden 1234-3618 von SEQ ID Nr. 1 besteht.
4. Peptid mit einer Sequenz gemäß SEQ ID Nr. 2.
5. Peptid mit einer Sequenz, welche die Aminosäuren 36-217 von SEQ ID Nr. 2 umfasst.
6. Peptid mit einer Sequenz, welche die Aminosäuren 233-794 von SEQ ID Nr. 2 umfasst.
7. Peptid nach Anspruch 4, welches AHL inaktiviert.
8. In vitro Verfahren zur Modulation der AHL-Signalaktivität, welches das in Kontaktbringen von AHL mit einem Peptid nach einem der Ansprüche 3 bis 7 umfasst.
9. Transgenische Pflanze, die eine Nukleinsäure nach Anspruch 2 umfasst.
10. Transgenisches, nicht-menschliches Tier, welches eine Nukleinsäure nach Anspruch 2 umfasst.
11. Verfahren zur Kontrolle einer bakteriellen Krankheit in einer Pflanze, welches die Verabreichung eines Peptides nach einem der Ansprüche 3 bis 7 zu dieser Pflanze umfasst, wobei die Expression der pathogenen Gene der Bakterien durch die AHL-Signale reguliert werden.
12. Verfahren zur Kontrolle einer bakteriellen Krankheit in einer Pflanze, welches die Transformation der Pflanze mit einer Nukleinsäure nach Anspruch 2 umfasst.
13. Verfahren zur Kontrolle einer bakteriellen Krankheit in einer Pflanze unter Verwendung eines Bakteriums, das mit einer Nukleinsäure nach Anspruch 2 transformiert ist.
14. Nukleinsäure nach Anspruch 2 oder Peptid nach einem der Ansprüche 3 bis 7 zur Verwendung in der Therapie.

15. Verwendung einer Nukleinsäure nach Anspruch 2 und seines Peptidproduktes für die Herstellung eines Medikamentes zur Kontrolle einer bakteriellen Krankheit in einem Säugetier, wobei die Expression der pathogenen Gene der Bakterien durch die AHL-Signale reguliert werden.

16. Verwendung eines Peptides nach einem der Ansprüche 3 bis 7 für die Herstellung eines Medikamentes zur Kontrolle einer bakteriellen Krankheit in einem Säugetier, wobei die Expression der pathogenen Gene der Bakterien durch die AHL-Signale reguliert werden.

17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, wobei das Säugetier ein Mensch ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

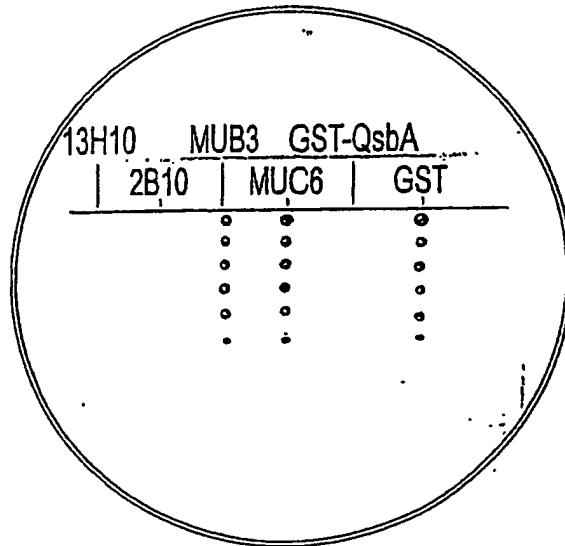


FIG. 1A

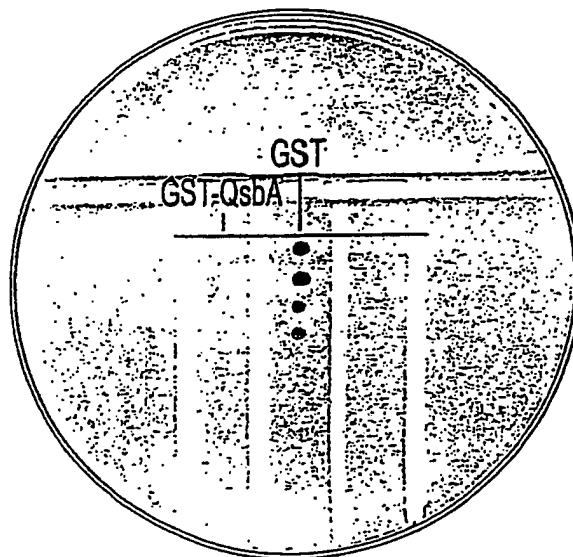


FIG. 1B

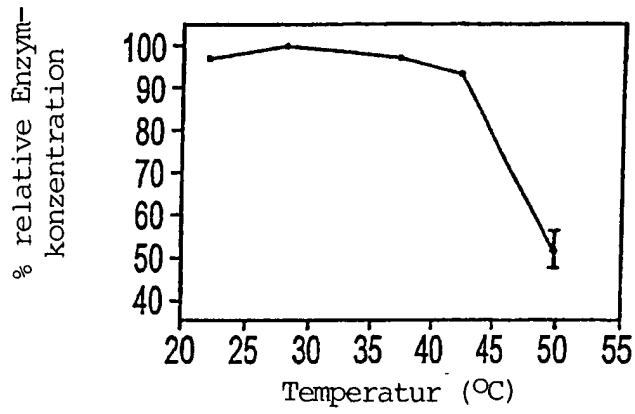


FIG. 2A

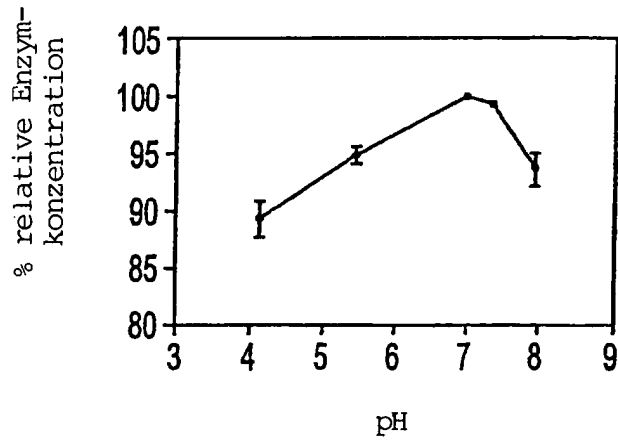


FIG. 2B

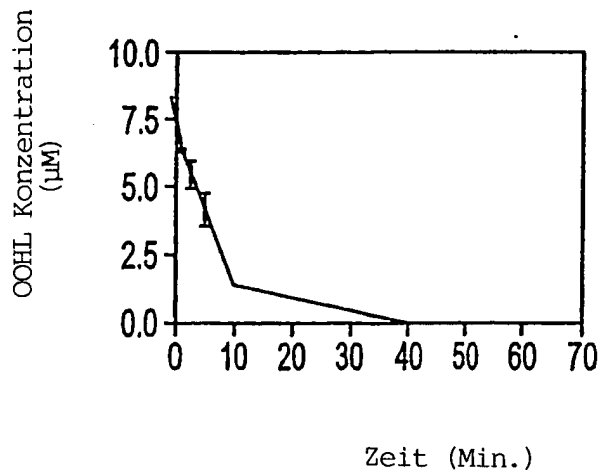


FIG. 3