



(12) PATENT

(19) NO

(11) 338398

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

**A61K 48/00 (2006.01)**  
**A61K 31/7088 (2006.01)**  
**A61K 38/00 (2006.01)**  
**C12N 15/11 (2006.01)**  
**A61P 35/00 (2006.01)**  
**C12N 15/113 (2010.01)**

## Patentstyret

|      |                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |      |                           |                                |
|------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------------------------|--------------------------------|
| (21) | Søknadsnr             | 20060906                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | (86) | Int.inng.dag og søknadsnr | 2004.07.23<br>PCT/GB2004/03235 |
| (22) | Inng.dag              | 2006.02.24                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | (85) | Videreføringsdag          | 2006.02.24                     |
| (24) | Løpedag               | 2004.07.23                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | (30) | Prioritet                 | 2003.07.25, GB, 0317466        |
| (41) | Alm.tilgj             | 2006.04.25                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |      |                           |                                |
| (45) | Meddelt               | 2016.08.15                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |      |                           |                                |
| (73) | Innehaver             | The University of Sheffield, Western Bank, GB-S102TN SHEFFIELD , Storbritannia                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |      |                           |                                |
| (72) | Oppfinner             | Thomas Helleday, Erik Dahlbergsgatan 38, SE-11532 STOCKHOLM, Sverige                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |      |                           |                                |
| (74) | Fullmektig            | Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |      |                           |                                |
| (54) | Benevnelse            | <b>Anvendelse av en poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-inhibitor for fremstilling av et medikament for behandling av cancerceller som er defekte med hensyn på homolog rekombinasjon (HR) og en poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-inhibitor for anvendelse ved behandling av cancerceller som er defekte med hensyn på homolog rekombinasjon (HR).</b>                                                                                                                                                                                                                                                               |      |                           |                                |
| (56) | Anførte publikasjoner | MASSUDA E. ET AL. GPI 6150, a PARP inhibitor, down-regulates metastasis associated S100A4 (Mtsl) and suppresses invasion of breast cancer cells in vitro. Prodceedings of the american association for cancer research annual Meeting, 2003, vol. 44, side 867-868. XP001181719 & 94th annual Meeting of the american Association for cancer Research; Washington, DC, USA, July 11-14, 2003 ISSN:0197-016X<br>WO 0212239 A<br>WO 9524379 A<br>Weltin D. ET AL. Effect of 6(5H)-phenanthridinone, an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, on cultured tumor cells. Oncol Res. 1994, vol. 6, no. 9, side 399-403. |      |                           |                                |
| (57) | Sammendrag            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |      |                           |                                |

Oppfinnelsen angår anvendelse av en substans som inhiberer aktiviteten til et enzym som medierer reparasjon av et trådbrudd i DNA for fremstilling av et medikament for behandling av sykdommer forårsaket av en defekt i et gen som medierer homolog rekombinasjon.

Foreliggende oppfinnelse angår anvendelse av en poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-inhibitor for fremstilling av et medikament for behandling av cancerceller, i særdeleshet brystcancerceller, som er defekte med hensyn på homolog rekombinasjon (HR). Oppfinnelsen angår videre en poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-inhibitor for  
 5 anvendelse ved behandling av cancerceller, i særdeleshet brystcancerceller, som er defekte med hensyn på homolog rekombinasjon (HR).

Homolog rekombinasjon (HR) er vist å spille en viktig rolle ved reparasjon av skader som oppstår ved DNA-replikasjonsforgrening i pattedyrceller (2). Celler som mangler  
 10 HR viser følgelig forsinket vekst og viser høyere nivå av genetisk ustabilitet. Det antas at genetisk ustabilitet på grunn av tap av HR-reparasjon ved humane cancer bidrar betydelig til utvikling av cancer i disse celler (1).

Post transkripsjonell modifisering av nukleære proteiner ved poly(ADP-ribosyl)lering  
 15 (PARP) som respons på brudd på DNA-tråden spiller en viktig rolle ved DNA-reparasjon, regulering av apoptose og opprettholdelse av genetisk stabilitet.

Poly(ADP-ribose)-polymerase (PARP-1) er et vanlig nukleærprotein i pattedyrceller som katalyserer dannelsen av poly(ADP-ribose) (PAR)-polymere ved anvendelse av  
 20  $\text{NAD}^+$  som substrat. Ved DNA-skade bindes PARP-1 raskt til et DNA-trådbrudd (enkeltrådet eller dobbeltrådet) og katalyserer tilførsel av negativt ladede PAR-kjeder til seg selv (automodifisering) og andre proteiner (se [3, 4] for en oversikt). Bindingen av PARP-1 til DNA-trådbrudd antas å beskytte DNA-skadene for videre prosessering inntil PARP-1 er dissosiert fra bruddet ved akkumulering av negativ ladning som et  
 25 resultat av PAR-polymerer (5,6).

Selv om PARP-1 er innblandet i flere kjerneprosesser, slik som modifisering av kromatinstrukturen, DNA-replikasjon, DNA-reparasjon og –transkripsjon, utvikles PARP-1-knockout mus normalt (7). Celler isolert fra disse mus har en  
 30 hyperrekombinasjonsfenotype og genetisk ustabilitet i form av økte nivåer av SCE, mikronukleus og tetraploiditet (8-10). Genetisk ustabilitet kan også forekomme i disse PARP-1 knockout mus ved telomer forkorting, økt frekvens av kromosomfusjon og aneuploiditet (11), selv om alle disse resultater ikke kan repeteres i et annet sett av PARP-1-knockout mus (12). I de første knockout mus, reddet PARP-1-null mutasjonen  
 35 den svekkede V(D)J-rekombinasjonen i SCID-mus (13).

Disse resultater støtter det syn som ble antydnet av Lindahl og samarbeidspartnere at PARP-1 har en beskyttende rolle mot rekombinasjon (5). De foreslo at binding av PARP-1 til DNA-brudd forhindret rekombinasjonsmaskineriet fra å gjenkjenne og prosessere DNA-lesjoner eller, alternativt, at de negative ladningene akkumulert etter poly-ADP-ribosylering frastøter naboliggende rekombinasjonsvillige DNA-sekvenser. Kun den siste modellen er i samsvar med at inhibisjonen av PARP-1 selv og ekspresjon av en dominant negativ mutant av PARP-1 som induserer SCE, genamplifisering og homolog rekombinasjon (HR [14-18]).

- 10 Studier basert på behandling av celler med PARP-inhibitorer eller celler avledet fra PARP-1 eller PARP-2 knockout mus indikerer at undertrykking av PARP-1-aktivitet øker cellenes mottakelighet for DNA-skadelige stoffer og inhiberer gjenforening av DNA-trådbrudd (3, 4, 8-11, 19, 20, 47).
- 15 Inhibitorer av PARP-1-aktivitet er blitt anvendt i kombinasjon med tradisjonelle anti-cancermidler slik som radioterapi og kjemoterapi (21). Inhibitorene ble anvendt i kombinasjon med metyleringsmidler, topoisomerasegifter og ioniserende stråling og ble funnet å øke effektiviteten til disse behandlingsformene. Slike behandlinger er imidlertid kjent for å medføre skade og død på ikke-cancerceller eller friske celler og er  
20 forbundet med uønskede bivirkninger.

- Kjent teknikk slik som den beskrevet i dokumentene MASSUDA E. ET AL. GPI 6150, a PARP inhibitor, down-regulates metastasis associated S100A4 (Mtsl) and suppresses invasion of breast cancer cells in vitro. Proceedings of the american association for cancer research annual Meeting, 2003, vol. 44, side 867-868;XP001181719 & 94th annual Meeting of the american Association for cancer Research; Washington, DC, USA, July 11-14, 2003 ISSN:0197-016X; WO 0212239 A; WO 9524379 A; and Weltin D. ET AL. Effect of 6(5H)-phenanthridinone, an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, on cultured tumor cells. Oncol Res. 1994, vol. 6, no. 9, side 399-403
- 30 beskriver beslektet teknologi, men beskriver ikke foreliggende oppfinnelse definert ved dens krav.

- Det er derfor et behov for en behandling mot cancer som både er effektiv og selektiv til å drepe cancerceller og som ikke trenger å bli administrert i kombinasjon med  
35 radioterapeutisk eller kjemoterapeutisk behandling.

Foreliggende oppfinnere har overraskende funnet at celler som mangler homolog rekombinasjon (HR) er hypersensitive overfor PARP-inhibitorer sammenlignet med villtypeceller. Dette er overraskende siden PARP-1-knowout mus lever normalt og dermed antyder at PARP-1 ikke er essensielt for levedyktighet. Følgelig bør det ikke  
 5 forventes at celler vil være sensitive overfor PARP-inhibisjon.

Ifølge et første aspekt ifølge oppfinnelsen frembringes anvendelse av en poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor for fremstilling av et medikament for behandling av cancerceller som er defekte med hensyn på homolog rekombinasjon (HR), der  
 10 cancercellene har en defekt i genet utvalgt fra gruppen bestående av XRCC1, CTPS RPA, RPA1, RPA2, RPA3, XPD, ERCC1, XPF, MMS19, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, DMC1, XRCC2, XRCC3, BRCA1, BRCA2, RAD52, RAD54, RAD50, MRE11, NBS1, WRN, BLM, Ku70, Ku80, ATM, ATR, chk1, chk2, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, RAD1, RAD9,  
 15 FEN-1, Mus81, Emel, DDS1 og BARD.

I en utførelsesform frembringer oppfinnelsen anvendelse der cancercellene som er defekte med hensyn på HR er delvis defekte med hensyn på HR.  
 20

Fortrinnsvis er medikamentet en farmasøytisk sammensetning bestående av PARP-inhibitoren i kombinasjon med en farmasøytisk akseptabel bærer eller fortynningsmiddel.

25 Den spesifikke sensitivitet til HR-defekte tumorer for PARP-1-inhibisjon betyr at normalt delende celler hos pasienten vil være uaffektert av behandlingen. Behandling av HR-defekte cancerceller ved anvendelse av en PARP-inhibitor har også den fordel at den ikke trenger å administreres som en kombinasjonsterapi sammen med  
 30 konvensjonelle radioterapeutiske eller kjemoterapeutiske behandlinger og dermed unngå bivirkningene forbundet med disse konvensjonelle behandlingsformer.

En genetisk defekt i et gen som medierer homolog rekombinasjon kan være forårsaket av en mutasjon i, fravær av eller uregelmessighet i ekspresjon, av et gen som koder for  
 35 et protein som er involvert i HR.

I en utførelsesform frembringer oppfinnelse anvendelse av en PARP-inhibitor for fremstilling av et medikament for indusering av apoptose i HR-defekte celler.

Videre beskrives en fremgangsmåte for å inducere apoptose i HR-defekte celler hos et pattedyr der fremgangsmåten omfatter administrering til pattedyret av en terapeutisk effektiv mengde av en PARP-inhibitor.

Ved å forårsake apoptose i HR-defekte celler bør det være mulig å redusere eller arrestere veksten av en tumor hos pattedyret.

10

Fortrinnsvis er de HR-defekte cellene cancerceller.

Cancerceller som er defekte i HR kan delvis eller totalt mangle HR. Fortrinnsvis er cancercellene totalt defisiente for HR.

15

Betegnelsen "cancer" eller "tumor" inkluderer lunge, kolon, pankreas, mage, ovarie-, cervix-, bryst- eller prostatacancer. Canceren kan også inkludere hud-, nyre-, lever-, blære- eller cerebrale cancer. I et foretrukket aspekt er canceren i et pattedyr, fortrinnsvis menneske.

20

Cancercellene som skal behandles kan være en arvelig cancercelleform der pasienten som skal behandles har en familiær predisposisjon for cancercellen. Fortrinnsvis er cancercellene som skal behandles en arvelig genkoplet cancercelle. I en foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen er cancercellene genkoplet arvelig brystcancer.

25

I et foretrukket aspekt er PARP-inhibitoren nyttig ved behandling av cancerceller som er defekte i ekspresjonen av et gen som er involvert i HR. Genene med den antydende funksjon i HR inkluderer XRCCI, ADPRT (PARP-1), ADPRTL2, (PARP-2), CTPS RPA, RPA1, RPA2, RPA3, XD, ERCC1, XPF, MMS19, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, DMC1, XRCC2, XRCC3, BRCA1, BRCA2, RAD52, RAD54, RAD50, MRE11, NBS1, WRN, BLM, Ku70, Ku80, ATM, ATR, chk1, chk2, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, RAD1, RAD9, FEN-1, Mus81, Eme1, DDS1, BARD (se 2, 3, 5, 22-28 for en oversikt).

35

Et gen involvert i HR kan være et tumorsuppressorgen. Oppfinnelsen frembringer således behandling av cancerceller som defekte i ekspresjon av et tumorsuppressorgen. Fortrinnsvis er tumorsuppressorgenet BRCA1 eller BRCA2.

Brystcancer er den mest vanlige cancersykdom blant kvinner i Vesten i dag. Visse familier har sterk predisposisjon for brystcancer, som ofte er forårsaket av en arvelig mutasjon i et allel av enten BRCA1 eller BRCA2. Disse pasientene bibeholder imidlertid fortsatt et funksjonelt allel. Følgelig utvikles disse pasientene normalt og har ingen fenotypiske konsekvenser av denne mutasjon. I en celle, kan imidlertid det funksjonelle allelet tapes hvilket gjør denne cellen til en cancercelle og på samme tid defisient for homolog rekombinasjon (HR). Dette trinnet er kritisk for starten på en tumor (1).

10

Foreliggende oppfinnelse har overraskende funnet at BRCA2 defisiente celler er 100 ganger mer sensitive overfor cytotoxisitet forårsaket av PARP-inhibitoren NU1025, enn villtypeceller.

15

I et foretrukket aspekt frembringes følgelig anvendelse av en PARP-inhibitor for fremstilling av et medikament for behandling av cancerceller defekte med hensyn på HR, for eksempel på grunn av tap av BRCA1- og/eller BRCA2-ekspresjon.

20

Cancercellene som skal behandles kan være delvis eller totalt defisiente med hensyn på BRCA1- eller BRCA2-ekspresjon. BRCA1- og BRCA2-mutasjoner kan identifiseres ved hjelp av multipleks PCR-teknikker, matriseteknikker (29, 30) eller andre screeningssystemer kjent for fagpersoner innen teknikken.

25

PARP-inhibitorer nyttige ifølge foreliggende oppfinnelse kan utvelges fra inhibitorer av PARP-1, PARP-2, PARP-3, PARP-4, tankyrase 1 eller tankyrase 2 (se 31 for en oversikt). I en foretrukket utførelsesform er PARP-inhibitoren nyttig ifølge oppfinnelsen en inhibitor av PARP-1 aktiviteten.

30

PARP-inhibitorer nyttige ifølge foreliggende oppfinnelse inkluderer benzimidazol-karboksamider, quinazolin-4-[3H]-oner og isoquinolinderivater (for eksempel 2-(4-hydroksyfenyl)benzimidazol-4-karboksamid (NU1085), 8-hydroksy-2-metylquinazolin-4-[3H]-on (NU1025); 6(5H)fenantridinon; 3 aminobenzamid; benzimidazol-4-karboksamider (BZ1-6) og tricyklisk laktamindoler (TI1-5) [32]. Andre inhibitorer av PARP kan identifiseres enten ved design [33] eller den nye "FlashPlate" analysen [34].

35

PARP-inhibitoren formulert som en farmasøytisk sammensetning kan administreres på en hvilken som helst effektiv, vanlig måte som er effektivt for målsøking av

cancerceller inkludert, for eksempel oral administrering, intravenøs, intramuskulær, intradermal, intranasal og topiske administreringer blant annet. Bærere eller fortynningsmidler nyttige i den farmasøytiske sammensetningen kan inkludere, men er ikke begrenset til, saltvann, bufret saltvann, dekstrose, vann, glyserol, etanol og  
5 kombinasjoner av disse.

Innen terapi eller som profylakse kan det aktive stoffet administreres til et individ som en injiserbar sammensetning, for eksempel som en steril vandig dispersjon. Inhibitoren kan administreres direkte til en tumorcelle eller kan målsøkes til tumorcellen via  
10 systemisk administrering.

En terapeutisk effektiv mengde av inhibitoren er typisk en som er tilstrekkelig for å oppnå den ønskede effekten og kan variere i henhold til egenskapene og alvorlighetsgraden av sykdommen og styrken til inhibitoren. Det vil forstås at ulike  
15 konsentrasjoner kan anvendes ved profylakse enn for behandling av en aktiv sykdom.

For administrering til pattedyr, og spesielt menneske, er det forventet at det daglige dosenivå av det aktive middel vil være opptil 100 mg/kg, for eksempel fra 0,01 mg/kg til 50 mg/kg kroppsvekt, typisk opptil 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10, 15, 20 eller 30 mg/kg  
20 kroppsvekt. Til syvende og sist bestemmes imidlertid mengden av inhibitoren som administreres og ved hvilken hyppighet midlet skal administreres av den behandlende lege.

En terapeutisk fordel ved anvendelse av PARP-inhibitorer for behandling av  
25 cancerceller er at kun svært små doser er nødvendig for å gi en terapeutisk effekt ved behandling av cancercellene og dermed reduseres den systemiske akkumulering av inhibitoren og de toksiske bivirkningene som er forbundet med denne.

Et foretrukket aspekt ifølge oppfinnelsen frembringer anvendelse av en PARP-inhibitor der PARP-inhibitoren er et inhibitorisk RNA (RNAi) molekyl.  
30

En teknikk for spesifikt å fjerne genfunksjonen er ved å introdusere dobbeltrådet RNA, også betegnet som inhibitorisk RNA (RNAi) inn i cellene hvilket resulterer i destruksjon av mRNA som er komplementært med sekvensen inkludert i RNAi-  
35 molekylet. RNAi-molekylet omfatter to komplementære tråder av RNA (en senstråd og antisenstråd) annealet til hverandre for å danne et dobbeltrådet RNA-molekyl. RNAi-

molekylet er typisk avledet fra eksonsekvenser eller kodende sekvenser i genet som skal fjernes.

Fortrinnsvis er nevnte RNAi-molekyl avledet fra nukleinsyremolekylet omfattende en  
5 nukleinsyresekvens utvalgt fra gruppen bestående av:

- a) en nukleinsyresekvens ifølge sekvensen gjengitt i figur 9, 10, 11, 12, 13 eller 14 eller fragmenter av disse;
- b) en nukleinsyresekvens som hybridiserer med nukleinsyresekvensen vist i figur  
10 9, 10, 11, 12 eller 13 og som koder for et PARP-gen;
- c) en nukleinsyresekvens som omfatter sekvensene som er degenerert som et resultat av den genetiske kode til nukleinsyresekvensen definert i (a) og (b).

Nylige studier antyder at RNAi-molekyler varierende fra 100-1000 bp avledet fra  
15 kodende sekvenser er effektive inhibitorer for genekspresjon. Overraskende ble det funnet at kun noen få RNAi-molekyler er nødvendig for å blokkere genekspresjon hvilket innebærer at mekanismen er katalytisk. Virkningsstedet synes å være nukleært da lite, hvis i det hele tatt noen, RNAi er detekterbart i cytoplasma til cellene hvilket antyder at RNAi utøver sin effekt under mRNA-syntesen eller -prosesseringen.

20 Videre er det foretrukket at nevnte RNAi-molekyler ifølge oppfinnelsen har en lengde på mellom 10 nukleotidbaser (nb) – 1000nb. Mer foretrukket er at nevnte RNAi-molekyl har en lengde på 10nb, 20nb, 30nb, 40nb, 50nb, 60nb, 70nb, 80nb, 90nb eller 100nb. Enda mer foretrukket er at RNAi-molekylet er 21nb langt.

25 Enda mer foretrukket er at RNAi-molekylet omfatter nukleinsyresekvensen aaa agc cau ggu gga gua uga (PARP-1).

Mer foretrukket er at RNAi-molekylet består av nukleinsyresekvensen aag acc aau cuc  
30 ucc agu uca ac (PARP-2).

Mer foretrukket er at RNAi-molekylet består av nukleinsyresekvensen aag acc aac auc gag aac aac (PARP-3).

35 RNAi-molekylet kan omfatte modifiserte nukleotidbaser.

Foretrukne trekk for hvert aspekt ifølge oppfinnelsen er som for hver av de andre aspektene *mutatis mutandis*.

Foreliggende oppfinnelse vil nå bli beskrevet ved eksemplene og med henvisning til de  
5 følgende figurer, der:

Figur 1 er en kurve som viser at HR-defisiente celler er hypersensitive overfor den toksiske effekt forårsaket av inhibisjonen av PARP-1. Kolonifremvekst av kinesiske hamstercellelinjer AA8 (villtype), irs1SF (defisient i HR[4]), CXR3 (irs1SF tilført  
10 XRCC3 [2]), V79 (villtype), irs1 (defisient i HR[5]) eller irs1X2.2 (irs1 tilført XRCC2 [1]) ved eksponering for 3-AB (A), ISQ (B) eller NU1025 (C). Gjennomsnittsverdier (symbolene) og standard avvik (søylene) for minst tre eksperimenter er vist. Kolonifremvekstanalysen ble anvendt.

15 Figur 2 er en kurve som viser celleoverlevelse i nærvær av PARP-inhibitoren NU1025 i villtype V79 celler, BRCA2-defisiente VC-8-celler og VC-8-celler tilført funksjonelt BRCA2-gen (VC-8#13, VC-8+B2). Kolonifremvekstanalysen ble anvendt.

Figur 3 et histogram som viser prosentandel celler i apoptose etter en 72 timers  
20 inkubering med NU1025.

Figur 4 (a) Western blottanalyse av proteinlysat isolert fra MCF-7 (p53<sup>wt</sup>) eller MDA-MB-231 (p53<sup>wt</sup>) brystcancerceller etter 48 timers transfeksjon med siRNA. (b) Kolonifremvekst av siRNA-behandlede MCF-7-celler eller (c) MDA-MB-231-celler  
25 etter eksponering for PARP-inhibitoren NU1025. Gjennomsnitt (symboler) og standard avvik (søylene) for minst tre eksperimenter er vist.

Figur 5 BRCA2-defisiente celler lykkes ikke med å reparere en rekombinasjonslesjon dannes ved replikasjonsforgreningen ved inhibitorer av PARP. (a) Visualisering av  
30 dobbelttrådede brudd (DBSs) i BRCA2-funksjonelle eller defisiente celler etter en 24 timers behandling med NU1025 (0,1 mM) med pulsfelt gelelektroforese. Hydroksyurea 2 mM ble anvendt som en positiv kontroll. (b) Visualisering av  $\gamma$ H2Ax foci hos ubehandlede V-C8+B2- og V-C8-celler. Antall celler inneholdende  $\gamma$ H2Ax foci (c) eller RAD51 foci (d) visualisert i V-C8+B2- og V-C8-celler etter en 24 timers behandling  
35 med NU1025 (10  $\mu$ m). Gjennomsnitt (symboler) og standardfeil (søylene) for tre til ni eksperimenter er vist. (e) En foreslått modell for celledød induisert i BRCA2-defisiente celler.

Figur 6 PARP-1 og ikke PARP-2 er viktig ved å forhindre dannelse av en rekombinogen lesjon, hvilket fører til død i fravær av BRCA2. (a) RT-PCR på RNA isolert fra SW480SN.3-celler behandlet med BRCA2, PARP-1 og PARP-2 siRNA i kombinasjon som vist i 48 timer. (b) Klonogen overlevelse etter 48 timers mangel på BRCA2, PARP-1 og PARP-2. Gjennomsnitt (symboler) og standard avvik (søyler) for minst tre eksperimenter er vist. To og tre stjerner viser statistisk signifikans i *t-test* på henholdsvis  $p < 0,01$  og  $p < 0,001$ . (c) Western blott for PARP-1 i SW480SN.3-celler behandlet med ulike siRNA.

10

Figur 7. (a) Visualisering av PAR-polymerer i ubehandlede og (b) tymidinbehandlede V79-celler (5 mm i 24 timer). (c) Prosentandel celler inneholdende  $>10$  seter for PARP-aktivitet etter behandling med hydroksyurea (0,2 mm) og tymidin (5 mm). Minst 300 kjerner ble telt for hver behandling og eksperiment. (d) Overlevelse av V-C8+B2-celler etter samtidig behandling med hydroksyurea eller (e) tymidin og NU1025 (10  $\mu$ m). (f) Aktiviteten til PARP ble målt ved nivået av fri NAD(P)H, etterbehandling med MMS, hydroksyurea (0,5 mm) eller tymidin (10 mm). Gjennomsnitt (symbol) og standardavvik (søyler) fra minst tre eksperimenter vises.

15

Figur 8. (a) Visualisering av PAR-polymerer i ubehandlede V-C8- og (b) V-C8+B2-celler. (c) Kvantifisering av prosentandel celler inneholdende  $>10$  seter for PARP-aktivitet i ubehandlede V-C8- og V-C8+B2-celler. (d) Nivå av NAD(P)H målt i ubehandlede V-C8- og V-C8+B2-celler. Tre stjerner angir  $p < 0,001$  i *t-test*. (e) Visualisering av RAD51 og seter for PARP-aktivitet i V79-celler etter en 24-timers tymidinbehandling (5 mm). (f) En modell for rollen til PARP og HR ved "stalled" replikasjonsforgreninger.

20

25

Figur 9 viser den humane cDNA-sekvensen til PARP-1.

Figur 10 viser den humane cDNA-sekvensen til PARP-2.

30

Figur 11 viser den humane cDNA-sekvensen til PARP-3.

Figur 12 viser den humane gDNA-sekvensen til tankyrase 1.

35

Figur 13 viser den humane mRNA-sekvensen til tankyrase 2.

Figur 14 viser den humane mRNA-sekvensen til VPARP.

## Materialer og metoder

### 5 Cytotoksisitet til PARP-inhibitorer overfor HR-defekte celler; XRCC2, XRCC3 eller BRCA2

#### *Cellekultur*

irs-, irs1X2.1- og V79-4-cellelinjer ble gitt av John Tacker [40] og AA8-, irs1SF- og  
10 CXR3-cellelinjene ble gitt av Larry Thompson [41].

VC-8, VC-8+B2, VC-8#13 var en gave fra Malgorzata Zdzenicka [42]. Alle  
cellelinjene i denne studien ble dyrket i Dulbecco's modifiserte Eagle's medium  
(DMEM) tilsatt 10% føtalt bovinserum og penicillin (100 U/ml) og streptomycin sulfat  
15 (100 µg/ml) ved 37°C under en atmosfære inneholdende 5% CO<sub>2</sub>.

#### *Toksisitetsanalyse – kolonifremvekstanalyse*

500 celler suspendert i mediet ble sådd ut på Petri-skåler 4 timer før tilsetning av 3-AB,  
ISQ eller NU1025. ISQ og NU1025 ble oppløst i DMSO til en sluttkonsentrasjon på 0,2%  
20 i behandlingsmedium. 7-12 dager senere, når kolonier kunne observeres, ble disse  
koloniene fiksert og farget med metylen blått i metanol (4 g/l). Koloniene som besto av  
mer enn 50 celler ble deretter telt.

### Apoptoseeksperimenter

25 0,25x10<sup>6</sup> celler ble sådd ut på Petri-skåler og dyrket i fire timer før behandling med  
NU1025. Etter 72 timer ble cellene trypsinert og resuspendert med medium  
inneholdende eventuelle flytende celler fra den prøven. Cellene ble sentrifugert og  
resuspendert for apoptoseanalyse med FITC-konjugert anneksin-V og propidiumjodid  
30 (PI) (ApoTarget, Biosource International) ifølge produsentens retningslinjer. Prøvene  
ble analysert ved flowcytometri (Becton-Dickenson FACSort, 488 nm laser) og  
prosentandel apoptotiske celler ble bestemt ved den fraksjon av levende celler (PI-  
negative) som var bundet til FITC-konjugert anneksin-V.

### 35 Immunfluoresens

Celler ble sådd ut på dekkglass 4 timer før 24-timers behandlingen som antydnet. Etter behandlingen ble mediet fjernet og dekkglasset skylt en gang i PBS ved 37°C og fiksert som beskrevet på annet hold [2]. De primære antistoffene og fortynningene som ble anvendt i denne studien var; kanin polyklonalt anti-PAR (Trevigen; 1:500), geit polyklonalt anti-Rad51 (C-20, Santa Cruz; 1:200) og kanin polyklonal anti-Rad51 (H-92, Santa Cruz; 1:1000). De sekundære antistoffene var Cy-3-konjugert geit anti-kanin IgG-antistoff (Zymed; 1:500), Alexa 555 geit-anti-kanin F(ab')<sub>2</sub> IgG antistoff (Molecular Probes; 1:500) Alexa 546 esel anti-geit IgG antistoff (Molecular Probes; 1:500) og Alexa 488 esel anti-kanin IgG antistoff (Molecular Probes; 1:500).

Antistoffene ble fortynnet i PBS inneholdende 3% bovint serumalbumin. DNA ble farget med en µg/ml To Pro (Molecular Probes). Bilder ble oppnådd med et Zeiss LSM 510 inverts konfokalt mikroskop ved anvendelse av planapokromat 63X/NA 1,4 olje immersjonsobjektiv og eksiteringsbølgelengde 488, 546 og 630 nm. Gjennom fokusering ble maksimale projeksjonsbilder frembrakt fra optiske snitt 0,50 µm fra hverandre og med en snittykkelse på 1,0 µm. Bildene ble prosessert ved hjelp av Adobe PhotoShop (Abacus Inc.). Minst 300 kjerner ble telt på hvert objekts glass og de som inneholdt mer enn 10 RAD51 foci eller seter for PARP-aktivitet ble klassifisert som positive.

#### 20 PARP-aktivitetsanalyse

Et vannløselig tetrazoliums salt (5 mm WST-8) ble anvendt for å følge mengden av NAD(P)H gjennom sin reduksjon til et gulfarget formazanfargestoff [43]. 5000 celler ble sådd ut i minst triplikater til brønner i 96 plater og dyrket i 100 µl normalt vekstmedium i 4 timer ved 37°C. CK8-buffer (Dojindo Molecular Technology, Gaithersburg, USA) inneholdende WST-8, ble deretter tilsett enten med eller uten behandling med DNA-skadelige midler med de angitte konsentrasjoner. Reduksjon av WST-8 i nærvær av NAD(P)H ble bestemt ved å måle synlig absorbans (OD<sub>450</sub>) hvert 30. minutt. En blank mediumprøve ble også tilberedt inneholdende kun medium og CK8-buffer. Endringer i NAD(P)H-nivåene ble beregnet ved å sammenligne absorbansen i brønner inneholdende celler behandlet med DNA-skadelige midler og de som var behandlet med DMSO alene. Relative nivåer av NAD(P)H i ulike cellelinjer ble beregnet etter 4 timer inkubering i CK8-buffer.

Evnen NU1025 har til å inhibere PARP-1-aktiviteten ble også analysert i permeabiliserte celler ved anvendelse av en modifisering av fremgangsmåten ifølge Halldorsson et al. [44], og beskrevet i detalj annensteds [45]. I korthet: 300 µl NU1025-

behandlede (15 min) permeabiliserte celler ble inkubert ved 26°C med oligonukleotid (sluttkonsentrasjon 2,5 µg/ml), 75 µM NAD + [<sup>32</sup>P] NAD (Amersham Pharmacia, Amersham, UK) i et totalvolum på 400 µl. Reaksjonen ble terminert etter 5 minutter ved å tilsette iskald 10% TCA 10% Na Ppi i 60 minutter før filtrering gjennom et

5 Whatman GF/C-filter (LabSales, Maidstone, UK), skylt 6 ganger med 1% TCA 1% NaPpi, satt til tørking og inkorporert radioaktivitet ble målt for å bestemme PARP-1-aktiviteten. Data uttrykkes som pmol NAD inkorporert /10<sup>6</sup> celler i forhold til [<sup>32</sup>P] NAD-standarder.

#### 10 Puls-felt gelelektroforese

1,5x10<sup>6</sup> celler ble sådd ut på 100 mm skåler og hensatt i 4 timer for å feste seg. Eksponering for medikament var i 18 timer, deretter ble cellene trypsinert og 10<sup>6</sup> celler ble smeltet inn i 1% agarose innsatser. Disse innsatsene ble inkubert som beskrevet

15 annensteds (8) og separert ved puls-felt gelelektroforese i 24 timer (BioRad; 120° vinkel, 60 til 240 sekunder switch-tid, 4 V/cm). Gelen ble deretter farget med etidium-bromid for analyse.

#### siRNA-behandling

20

En på forhånd designet BRCA2 SMARTpool og "scrambled" siRNA ble skaffet (Dharmacon, Lafayette, CO). 10000 celler ble sådd ut på 6 brønns plater og hensatt over natten før transfeksjon med 100 nm siRNA ved anvendelse av oligofectaminreagens (Invitrogen) ifølge produsentens instruksjoner. Cellene ble deretter dyrket i normalt

25 vekstmedium i 48 timer før trypsinering og sådd ut igjen for toksisitetsanalyser. Suppresjon av BRCA2 ble bekreftet ved Western blott (som beskrevet tidligere [46] av proteinekstrakter behandlet med siRNA med et antistoff mot BRCA2 (Oncogen, Nottingham, UK).

#### 30 **EKSEMPLER**

##### Homolog rekombinasjonsdefisiente celler er hypersensitive overfor PARP-1-inhibisjon

For å undersøke betydningen av HR i den cellulære responsen ved inhibisjon av PARP-1, ble effektene av PARP-1-inhibitorer på overlevelse av HR-reparasjonsdefisiente

35 cellelinjer studert. Det ble funnet at celler defisiente i HR (dvs. irs1 SF som er defekte i XRCC3 eller irs1 som er defekte i XRCC2 [se tabell 1] var svært sensitive overfor den toksiske effekten av 3-aminobenzamid (3-AB) og overfor to mer potente inhibitorer av

PARP-1: 1,5-dihydroksyisoquinolin (ISQ; [37]) eller 8-hydroksy-2-metylquinazolinon (NU1025 [38, 39]) (figur 1). Sensitiviteten i irs1SF-celler overfor 3-AB, ISQ eller NU1025 ble korrigert ved introduksjon av et kosmid inneholdende et funksjonelt XRCC3-gen (CXR3). Tilsvarende ble sensitiviteten i irs1-celler overfor 3-AB, ISQ eller  
 5 NU1025 korrigert ved introduksjon av et kosmid inneholdende et funksjonelt XRCC2-gen (irs1X2.2).

#### BRCA2-defisiente celler er hypersensitive overfor PARP-1-inhibisjon

10 Overlevelsen av BRCA2-defisiente celler (VC8) og villtypeceller (V79Z) i nærvær av inhibitorer av PARP-1 ble studert. Det ble funnet at VC8-celler er svært sensitive overfor den toksiske effekten av NU1025 (fig. 2). Sensitiviteten i VC8-cellene ble korrigert ved introduksjon av et funksjonelt BRCA2-gen enten på kromosom 13 (VC8#13) eller på en overekspresjonsvektor (VC8+B2). Dette resultatet viser at  
 15 sensitiviteten overfor PARP-1-inhibitorer er en direkte konsekvens av tapet av BRCA2-funksjonen.

For å undersøke om inhibisjonen av PARP-1 trigger apoptose i BRCA2-defisiente celler, ble nivået av apoptose 72 timer etter eksponering for NU1025 undersøkt. Det ble  
 20 funnet at NU1025 startet apoptosen kun i VC8-celler, hvilket viser at tap av PARP-1-aktivitet i BRCA2-defisiente celler starter denne form for celledød (fig. 3).

#### BRCA2-defisiente brystcancerceller er hypersensitive overfor PARP-1-inhibisjon

25 Det ble undersøkt om MCF7 (villtype p53) og MDA-MB-231 (mutert p53) brystcancercellelinjer viste en tilsvarende sensitivitet overfor NU1025 ved mangel på BRCA2. Det ble funnet at PARP-1-inhibitorer betydelig reduserte overlevelsen av MCF7- og MDA-MB-231-celler kun når BRCA2 manglet med en blanding av BRCA2 siRNA (fig. 4). Dette viser at BRCA2 manglende brystcancerceller er sensitive overfor  
 30 PARP-inhibitorer uavhengig av p53-statusen.

#### BRCA2-defisiente celler dør av PARP-1-inhibisjon i fravær av dobbeltrådede DNA bruddpunkt (DSB) men i nærvær av $\gamma$ H2Ax

35 HR er vist å være involvert i reparasjonen av DSB og andre lesjoner som forekommer under DNA-replikasjon [2]. For å bestemme om sensitiviteten til BRCA2-defisiente celler er resultatet av en manglende evne til å reparere DSB etter NU1025-behandling,

ble akkumulering av DSB i V79- og V-C8-celler målt etter behandling med svært toksiske nivåer av NU1025. Det ble funnet at ikke noe DSB var påvisbart ved pulsfelt gelelektroforeseanalyse av DNA oppnådd fra de behandlede cellene (fig. 5A), hvilket antyder at lave nivåer av DSB eller andre rekombinogene substrater akkumulerer etter

5 PARP-inhibisjon i HR-defisiente celler, hvilket trigger  $\gamma$ H2Ax (fig. 5B). Årsaken til hvorfor BRCA2-defisiente celler dør etter induksjon av disse rekombinogene lesjoner er sannsynligvis forårsaket av en manglende evne til å reparere slike lesjoner. For å teste dette ble evnen BRCA2-defisiente V-C8-celler og BRCA2-komplimenterte celler har til å danne RAD51-foci som respons på NU1025 bestemt. Det ble funnet at RAD51-foci

10 virkelig ble induisert i V-C8+B2-celler etter behandling med NU1025 (statistisk signifikans i t-test  $p < 0,05$ ; figur 5D). Dette antyder at de rekombinogene lesjoner trigger HR-reparasjon i disse celler hvilket muliggjør at disse overlever. I motsetning var BRCA2-defisiente V-C8-celler ikke i stand til å danne RAD51-foci som respons på NU1025-behandling (figur 5D) hvilket antyder null HR, som igjen vil føre til at de

15 rekombinogene lesjoner ikke repareres og følgelig føre til celledød.

#### PARP-1 og ikke PARP-2 er viktig ved å forhindre dannelsen av en rekombinogen lesjon

Det er to hoved PARP tilstede i kjernen i pattedyrceller, PARP-1 og PARP-2 og alle

20 rapporterte PARP-inhibitorer inhiberer begge. For å skille hvilken PARP som var ansvarlig for denne effekten, ble det undersøkt om å fravær av PARP-1 og/eller PARP-2 resulterer i akkumulering av toksiske lesjoner, ved depresjon av disse og BRCA2 med siRNA i humane celler (figur 6a). Det ble funnet at den klonogene overlevelse var betydelig redusert når både PARP-1- og BRCA2-proteiner manglet samtidig i humane

25 celler (figur 6b). Mangel på PARP-2 med BRCA2 hadde ingen effekt på den klonogene overlevelsen og mangel på PARP-2 i PARP-1 og BRCA2-manglende celler førte til ikke ytterligere toksisitet. Disse resultater antyder at PARP-1 og ikke PARP-2 er ansvarlig for reduksjon av toksiske rekombinogene lesjoner i humane celler.

Kloningseffektiviteten ble kun redusert til 60% i forhold til kontrollen i celler som både

30 manglet PARP-1 og BRCA2, mens ingen HR-defisiente celler overlevde behandlingen med PARP-inhibitorer. Dette henger sannsynligvis sammen med ufullstendig depresjon av det riktig forekommende PARP-1-protein ved siRNA (figur 6c), hvilket kan være tilstrekkelig for å opprettholde PARP-1-funksjon i noen av cellene.

#### 35 PARP-1 aktiveres ved replikasjonsinhibitorer

HR er også involvert i reparasjon av lesjoner som forekommer ved "stalled" replikasjonsforgreninger, som ikke trenger å involvere detekterbart DSB [2]. For å teste om PARP har en rolle ved replikasjonsforgreninger, ble PARP-aktivering i celler behandlet med stoffer (tymidin eller hydroksyurea) som retarderer eller stopper progresjonen av DNA-replikasjonsforgreningen undersøkt. Tymidin depleterer celler for dCTP og reduserer replikasjonsforgreningen uten å forårsake DSB. Hydroksyurea repleterer flere dNTP og blokkerer replikasjonsforgreningen, hvilket er forbundet med dannelse av DSB ved replikasjonsforgreningen [2]. Begge disse midlene induserer potensielt HR [2]. V79-hamsterceller behandlet i 24 timer med tymidin eller hydroksyurea ble farget på for PAR-polymeraser. Dette ga en betydelig økning i antall celler inneholdende seter for PARP-aktivitet (figur 7C). Dette resultat antyder en funksjon for PARP ved "stalled" replikasjonsforgreninger. Det ble også vist at inhibisjon av PARP med NU1025 økte sensitiviteten overfor tymidin eller hydroksyurea i V-C8+B2-celler (figur 7D,E). Dette resultat antyder at PARP-aktiviteten er viktig ved reparasjon av "stalled" replikasjonsforgreninger eller alternativt at det forhindrer induksjon av celledød i celler med "stalled" replikasjonsforgreninger.

PARP aktiveres raskt ved DNA-enkeltrådede brudd (SSB) og tiltrekker DNA-reparasjonsenzymmer [3-6]. Metylmetansulfonat (MMS) medfører alkylering av DNA, hvilket repareres ved basefjerningsreparasjon. PARP aktiveres raskt ved SSB-intermediatet dannet under denne reparasjon, hvilket reduserer NAD(P)H-nivåene (figur 7F). Det ble funnet at aktivering av PARP og reduksjon av NAD(P)H-nivåene er mye langsommere etter tymidin eller hydroksyureabehandling. Denne langsomme PARP-aktivering kan forklares ved den indirekte virkning av tymidin og hydroksyurea og den tiden som er nødvendig for å akkumulere "stalled" replikasjonsforgreninger ettersom celler trer inn i S-fasen av cellyklusen.

#### PARP-1 og HR spiller ulike roller ved "stalled" replikasjonsforgreninger

Antall PARP-aktivitets seter i ubehandlede BRCA2- defisiente V-C8-celler ble bestemt. Det ble funnet at flere V-C8-celler inneholdt seter for PARP-aktivitet sammenlignet med V-C8+B2-celler (figur 8A,B,C). V-C8-celler hadde også lavere fri NAD(P)H-nivåer enn de korrigerte celler (figur 8D), hvilket er et sannsynlig resultat av den økte PARP-aktivitet. Viktig er at disse setene for PARP-aktivitet ikke overlapper med RAD51-foci (figur 8E).

Resultatene her i dokumentet antyder at PARP og HR spiller forskjellige roller ved beskyttelse eller bergingen av "stalled" replikasjonsforgreninger (figur 8F). Tap av PARP-aktivitet kan kompenseres ved økt HR mens et tap av HR kan kompenseres ved økt PARP-aktivitet. Imidlertid fører tap av begge disse reaksjonsveier til akkumulering av "stalled" replikasjonsforgreninger og celledød, som vist i det tilfellet at PARP inhiberte BRCA2-defisiente celler.

Slik det vises i modellen skissert i figur 8F spiller PARP og HR komplementære roller ved "stalled" replikasjonsforgreninger. (i) Replikasjonsforgreningene kan holdes tilbake når den møter på en veisperring på DNA-templatene. I tillegg kan den også holdes tilbake midlertidig, på grunn av mangel på dNTP eller andre replikasjonsko-faktorer. (ii) PARP-binder tilbakeholdte replikasjonsforgreninger eller andre replikasjonsassosierte skader, hvilket trigger PAR-polymerisering. De dannede negativt ladede PAR-polymerer kan beskytte de tilbakeholdte replikasjonsforgreninger, ved å frastøte proteiner som normalt ville bearbeide replikasjonsforgreningene (for eksempel resolvaser), inntil replikasjonsforgreningen kan gjenopprettes spontant når dNTP eller andre ko-faktorer blir tilgjengelige. Alternativt kan PAR-polymerer eller PARP tiltrekke proteiner for å løse opp replikasjonsblokkeringen på andre. (iii) I fravær av PARP-aktivitet kan HR anvendes som en alternativ reaksjonsvei for å reparere tilbakeholdte replikasjonsforgreninger. Denne kompensasjonsmodellen forklarer det økte nivå av HR og RAD51-foci funnet i PARP-defisiente celler og den høye PARP-aktivitet funnet i HR-defisiente celler (dvs. V-C8). Spontan replikasjonsblokkering/lesjoner er kun letale i fravær av både PARP og HR.

## 25 **TABELL 1**

Genotype og opprinnelse av cellelinjene som er anvendt i denne studien.

| Cellelinje | Genotype          | Defekt                | Opprinnelse | Referanse |
|------------|-------------------|-----------------------|-------------|-----------|
| AA8        | Wt                | Wt                    | CHO         | [41]      |
| Irs1SF     | XRCC3             | XRCC3, defisient i HR | AA8         | [41]      |
| CXR3       | XRCC3<br>+ hXRCC3 | Wt                    | irs1SF      | [41]      |
| V79-4      | Wt                | Wt                    | V79         | [40]      |

|          |                   |                       |       |      |
|----------|-------------------|-----------------------|-------|------|
| irs1     | XRCC2             | XRCC2, defisient i HR | V79-4 | [40] |
| irs1X2.2 | XRCC2<br>+ hXRCC2 | Wt                    | irs1  | [40] |
| V79-Z    | Wt                | Wt                    | V79   | [42] |
| VC8      | BRCA2             | BRCA2, defisient i HR | V79-Z | [42] |
| VC8#13   | BRCA2<br>+ hBRCA2 | Wt                    | VC8   | [42] |
| VC8+B2   | BRCA2<br>+ hBRCA2 | Wt                    | VC8   | [42] |

**REFERANSER:**

- [1] A.R. Venkitaraman Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2, *Cell* 108 (2002) 171-182.
- [2] C. Lundin, K. Erixon, C. Arnaudeau, N. Schultz, D. Jenssen, M. Meuth and T. Helleday Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells, *Mol Cell Biol* 22 (2002) 5869-5878.
- [3] D. D'Amours, S. Desnoyers, I. D'Silva and G.G. Poirier Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions, *Biochem J* 342 (1999) 249-268.
- [4] Z. Herceg and Z.Q. Wang Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death, *Mutat Res* 477 (2001) 97-110.
- [5] T. Lindahl, M.S. Satoh, G.G. Poirier and A. Klungland Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks, *Trends Biochem Sci* 20 (1995) 405-411.
- [6] M.S. Satoh and T. Lindahl Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair, *Nature* 356 (1992) 356-358.
- [7] S. Shall and G. de Murcia Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?, *Mutat Res* 460 (2000) 1-15.
- [8] Z.Q. Wang, L. Stingl, C. Morrison, M. Jantsch, M. Los, K. Schulze-Osthoff and E.F. Wagner PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis, *Genes Dev* 11 (1997) 2347-2358.
- [9] C.M. Simbulan-Rosenthal, B.R. Haddad, D.S. Rosenthal, Z. Weaver, A. Coleman, R. Luo, H.M. Young, Z.Q. Wang, T. Ried and M.E. Smulson Chromosomal aberrations in PARP(-/-) mice: genome stabilization in immortalized cells by reintroduction of poly(ADP-ribose) polymerase cDNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 13191-13196.
- [10] J.M. de Murcia, C. Niedergang, C. Trucco, M. Ricoul, B. Dutrillaux, M. Mark, F.J. Oliver, M. Masson, A. Dierich, M. LeMeur, C. Walztinger, P. Chambon and G. de Murcia Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 7303-7307.

- [11] F. d'Adda di Fagagna, M.P. Hande, W.M. Tong, P.M. Lansdorp, Z.Q. Wang and S.P. Jackson Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability, *Nat Genet* 23 (1999) 76-80.
- [12] E. Samper, F.A. Goytisolo, J. Menissier-de Murcia, E. Gonzalez-Suarez, J.C. Cigudosa, G. de Murcia and M.A. Blasco Normal telomere length and chromosomal end capping in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice and primary cells despite increased chromosomal instability, *J Cell Biol* 154 (2001) 49-60.
- [13] C. Morrison, G.C. Smith, L. Stingl, S.P. Jackson, E.F. Wagner and Z.Q. Wang Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis, *Nat Genet* 17 (1997) 479-482.
- [14] V. Schreiber, D. Hunting, C. Trucco, B. Gowans, D. Grunwald, G. De Murcia and J.M. De Murcia A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 4753-4757.
- [15] J.H. Kupper, M. Muller and A. Burkle Trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation potentiates carcinogen induced gene amplification in SV40-transformed Chinese hamster cells, *Cancer Res* 56 (1996) 2715-2717.
- [16] J. Magnusson and C. Ramel Inhibitor of poly(ADP-ribose)transferase potentiates the recombinogenic but not the mutagenic action of alkylating agents in somatic cells in vivo in *Drosophila melanogaster*, *Mutagenesis* 5 (1990) 511-514.
- [17] A.S. Waldman and B.C. Waldman Stimulation of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells by an inhibitor of poly(ADP-ribosylation), *Nucleic Acids Res* 19 (1991) 5943-5947.
- [18] A. Semionov, D. Cournoyer and T.Y. Chow Inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase stimulates extrachromosomal homologous recombination in mouse Ltk-fibroblasts, *Nucleic Acids Res* 27 (1999) 4526-4531.
- [19] F. Dantzer, V. Schreiber, C. Niedergang, C. Trucco, E. Flatter, G. De La Rubia, J. Oliver, V. Rolli, J. Menissier-de Murcia and G. de Murcia Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair, *Biochimie* 81 (1999) 69-75.

- [20] F. Dantzer, G. de La Rubia, J. Menissier-De Murcia, Z. Hostomsky, G. de Murcia and V. Schreiber Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1, *Biochemistry* 39 (2000) 7559-7569.
- [21] L. Tentori, I. Portarena and G. Graziani Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors, *Pharmacol Res* 45 (2002) 73-85.
- [22] T. Lindahl and R.D. Wood Quality control by DNA repair, *Science* 286 (1999) 1897-1905.
- [23] K.W. Caldecott DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia, *Cell* 112 (2003) 7-10.
- [24] D. D'Amours and S.P. Jackson The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002) 317-327.
- [25] A.D. D'Andrea and M. Grompe The Fanconi anaemia/BRCA pathway, *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 23-34.
- [26] S.P. Jackson Sensing and repairing DNA double-strand breaks, *Carcinogenesis* 23 (2002) 687-696.
- [27] R. Kanaar, J.H. Hoeijmakers and D.C. van Gent Molecular mechanisms of DNA double strand break repair, *Trends Cell Biol* 8 (1998) 483-489.
- [28] D.C. van Gent, J.H. Hoeijmakers and R. Kanaar Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection, *Nat Rev Genet* 2 (2001) 196-206.
- [29] S.L. Neuhausen and E.A. Ostrander Mutation testing of early-onset breast cancer genes BRCA1 and BRCA2, *Genet Test* 1 (1997) 75-83.
- [30] G. Kuperstein, W.D. Foulkes, P. Ghadirian, J. Hakimi and S.A. Narod A rapid fluorescent multiplexed-PCR analysis (FMPPA) for founder mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes, *Clin Genet* 57 (2000) 213-220.
- [31] A. Chiarugi Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited, *Trends Pharmacol Sci* 23 (2002) 122-129.
- [32] C.R. Calabrese, M.A. Batey, H.D. Thomas, B.W. Durkacz, L.Z. Wang, S. Kyle, D. Skalitzky, J. Li, C. Zhang, T. Boritzki, K. Maegley, A.H. Calvert, Z. Hostomsky, D.R. Newell and N.J. Curtin Identification of Potent Nontoxic Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibitors: Chemopotential and Pharmacological Studies, *Clin Cancer Res* 9 (2003) 2711-2718.
- [33] D. Ferraris, Y.S. Ko, T. Pahutski, R.P. Ficco, L. Serdyuk, C. Alemu, C. Bradford, T. Chiou, R. Hoover, S. Huang, S. Lautar, S. Liang, Q. Lin, M.X.

- Lu, M. Mooney, L. Morgan, Y. Qian, S. Tran, L.R. Williams, Q.Y. Wu, J. Zhang, Y. Zou and V. Kalish Design and synthesis of poly ADP-ribose polymerase-1 inhibitors. 2. Biological evaluation of aza-5[H]-phenanthridin-6-ones as potent, aqueous-soluble compounds for the treatment of ischemic injuries, *J Med Chem* 46 (2003) 3138-3151.
- [34] K.J. Dillon, G.C. Smith and N.M. Martin A FlashPlate assay for the identification of PARP-1 inhibitors, *J Biomol Screen* 8 (2003) 347-352.
- [35] A.J. Pierce, R.D. Johnson, L.H. Thompson and M. Jasin XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells, *Genes Dev* 13 (1999) 2633-2638.
- [36] R.D. Johnson, N. Liu and M. Jasin Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination, *Nature* 401 (1999) 397-399.
- [37] G.M. Shah, D. Poirier, S. Desnoyers, S. Saint-Martin, J.C. Hoflack, P. Rong, M. ApSimon, J.B. Kirkland and G.G. Poirier Complete inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity prevents the recovery of C3H10T1/2 cells from oxidative stress, *Biochim Biophys Acta* 1312 (1996) 1-7.
- [38] R.J. Griffin, S. Srinivasan, K. Bowman, A.H. Calvert, N.J. Curtin, D.R. Newell, L.C. Pemberton and B.T. Golding Resistance-modifying agents. 5. Synthesis and biological properties of quinazolinone inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), *J Med Chem* 41 (1998) 5247-5256.
- [39] S. Boulton, L.C. Pemberton, J.K. Porteous, N.J. Curtin, R.J. Griffin, B.T. Golding and B.W. Durkacz Potentiation of temozolomide-induced cytotoxicity: a comparative study of the biological effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors, *Br J Cancer* 72 (1995) 849-856.
- [40] C.S. Griffin, P.J. Simpson, C.R. Wilson and J. Thacker Mammalian recombination-repair genes XRCC2 and XRCC3 promote correct chromosome segregation, *Nat Cell Biol* 2 (2000) 757-761.
- [41] R.S. Tebbs, Y. Zhao, J.D. Tucker, J.B. Scheerer, M.J. Siciliano, M. Hwang, N. Liu, R.J. Legerski and L.H. Thompson Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 6354-6358.

- [42] M. Kraakman-van der Zwet, W.J. Overkamp, R.E. van Lange, J. Essers, A. van Duijn-Goedhart, I. Wiggers, S. Swaminathan, P.P. van Buul, A. Errami, R.T. Tan, N.G. Jaspers, S.K. Sharan, R. Kanaar and M.Z. Zdzienicka Brca2 (XRCC11) deficiency results in radioresistant DNA synthesis and a higher frequency of spontaneous deletions, *Mol Cell Biol* 22 (2002) 669-679.
- [43] J. Nakamura, S. Asakura, S.D. Hester, G. de Murcia, K.W. Caldecott and J.A. Swenberg Quantitation of intracellular NAD(P)H can monitor an imbalance of DNA single strand break repair in base excision repair deficient cells in real time, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) e104.
- [44] H. Halldorsson, D.A. Gray and S. Shall Poly (ADP-ribose) polymerase activity in nucleotide permeable cells, *FEBS Lett* 85 (1978) 349-352.
- [45] K. Grube, J.H. Kupper and A. Burkle Direct stimulation of poly(ADP ribose) polymerase in permeabilized cells by double-stranded DNA oligomers, *Anal Biochem* 193 (1991) 236-239.
- [46] C. Lundin, N. Schultz, C. Arnaudeau, A. Mohindra, L.T. Hansen and T. Helleday RAD51 is Involved in Repair of Damage Associated with DNA Replication in Mammalian Cells, *J Mol Biol* 328 (2003) 521-535.
- [47] Schreider et al., *Journal of Biological Chemistry* 277: 23028-23036 (2002).

## P a t e n t k r a v

1.

Anvendelse av en poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-inhibitor for fremstilling av et  
 5 medikament for behandling av cancerceller som er defekte med hensyn på homolog  
 rekombinasjon (HR), der cancercellene har en defekt i genet utvalgt fra gruppen  
 bestående av XRCC1, CTPS RPA, RPA1, RPA2, RPA3, XPD, ERCC1, XPF, MMS19,  
 RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, DMC1, XRCC2, XRCC3, BRCA1, BRCA2,  
 RAD52, RAD54, RAD50, MRE11, NBS1, WRN, BLM, Ku70, Ku80, ATM, ATR,  
 10 chk1, chk2, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF,  
 FANCG, RAD1, RAD9, FEN-1, Mus81, Eme1, DDS1 og BARD.

2.

Anvendelse ifølge krav 1, der PARP-inhibitoren er utvalgt fra gruppen bestående av  
 15 PARP-1-, PARP-2-, PARP-3-, PARP-4-, tankyrase 1- og tankyrase 2-inhibitor.

3.

Anvendelse ifølge krav 2, der PARP-inhibitoren er en PARP-1-inhibitor.

20 4.

Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 -3, der PARP-inhibitoren er utvalgt  
 fra gruppen bestående av benzimidazol-karboksamider, quinazolin-4-[3H]-oner og  
 isoquinolinderivater.

25 5.

Anvendelse ifølge krav 4, der PARP-inhibitoren er utvalgt fra gruppen bestående av 2-  
 (4-hydroksyfenyl)benzimidazol-4-karboksamid, 8-hydroksy-2-metylquinazolin-4-[3H]-  
 on; 6(5H)fenantridinon, 3 aminobenzamid; benzimidazol-4-karboksamider og tricyklisk  
 laktamindoler.

30

6.

Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 -3, der PARP-inhibitoren er et  
 RNAi-molekyl spesifikt for et PARP-gen.

35

7.

Anvendelse ifølge krav 6, der RNAi-molekylet er avledet fra et nukleinsyremolekyl omfattende en nukleinsyresekvens utvalgt fra gruppen bestående av:

- a) en nukleinsyresekvens ifølge sekvensen gjengitt i figur 9, 10, 11, 12, 13 eller 14 eller fragmenter av disse;
- b) en nukleinsyresekvens som hybridiserer med nukleinsyresekvensen vist i figur 9, 10, 11, 12 eller 13 og som koder for et PARP-gen; eller
- c) en nukleinsyresekvens som omfatter sekvensene som er degenerert som et resultat av den genetiske kode til nukleinsyresekvensene definert i (a) og (b).

10

8.

Anvendelse ifølge krav 6 eller 7, der RNAi-molekylet omfatter nukleinsyresekvensen  
aaa agc cau ggu gga gua uga.

15 9.

Anvendelse ifølge krav 6 eller 7, der RNAi-molekylet består av nukleinsyresekvensen  
aag acc aau cuc ucc agu uca ac.

10.

20 Anvendelse ifølge krav 6 eller 7, der RNAi-molekylet består av nukleinsyresekvensen  
aag acc aac auc gag aac aac.

11.

25 Anvendelse ifølge de foregående kravene, der cancercellene som er defekte med hensyn  
på HR er delvis defekte med hensyn på HR.

12.

30 Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, der cancercellene som er  
defekte med hensyn på HR er totalt defekte med hensyn på HR.

13.

Anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, der defekten er en  
mutasjon i genet.

35 14.

Anvendelse ifølge et hvilket som de foregående kravene, der defekten er fravær av  
genet.

15.

- 5   Anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, der defekten er i ekspresjonen av genet.

16.

- 10   Anvendelse ifølge et hvilket som de foregående kravene, der cancercellene som skal behandles er utvalgt fra gruppen bestående av lunge-, kolon-, pankreas-, mage-, ovarie-, cervikal-, bryst- og prostatacancer.

17.

- 15   Anvendelse ifølge et hvilket som de foregående kravene, der cancercellene er i et menneske.

18.

- 20   Anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, der cancercellene som skal behandles er en genkoplet arvelig cancercelle.

19.

Anvendelse ifølge krav 18, der cancercellene som skal behandles er brystcancerceller.

20.

- 25   Anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, der cancercellene som skal behandles er defekte med hensyn på BRCA1-ekspresjon.

21.

- 30   Anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, der cancercellene som skal behandles er defekte med hensyn på BRCA2-ekspresjon.

22.

- 35   Anvendelse ifølge krav 20 eller 21, der cancercellene er delvis defisiente med hensyn på BRCA1- og/eller BRCA-2-ekspresjon.

23.

Anvendelse ifølge krav 20 eller 21, der cancercellene er totalt defisiente med hensyn på BRCA1- og/eller BRCA-2-ekspresjon.

24.

- 5   Anvendelse ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, der genet som medierer HR er et tumorsuppressorgen.

25.

Anvendelse ifølge krav 24, der tumorsuppressorgenet er BRCA1.

10

26.

Anvendelse ifølge krav 24, der tumorsuppressorgenet er BRCA2.

27.

- 15   Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor for anvendelse ved behandling av cancerceller som er defekte med hensyn på homolog rekombinasjon (HR), der cancercellene har en defekt i genet utvalgt fra gruppen bestående av XRCC1, CTPS RPA, RPA1, RPA2, RPA3, XPD, ERCC1, XPF, MMS19, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, DMC1, XRCC2, XRCC3, BRCA1, BRCA2, RAD52, RAD54,  
20   RAD50, MRE11, NBS1, WRN, BLM, Ku70, Ku80, ATM, ATR, chk1, chk2, FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, RAD1, RAD9, FEN-1, Mus81, Emel, DDS1 og BARD.

28.

- 25   PARP-inhibitor for anvendelse ifølge krav 27, der PARP-inhibitorern er utvalgt fra gruppen bestående av PARP-1-, PARP-2-, PARP-3-, PARP-4-, tankyrase 1- og tankyrase 2-inhibitor.

29.

- 30   PARP-inhibitor for anvendelse ifølge krav 28, der PARP-inhibitoren er en PARP-1-inhibitor.

30.

- 35   PARP-inhibitor for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 27-29, der PARP-inhibitoren er utvalgt fra gruppen bestående av benzimidazol-karboksamider, quinazolin-4-[3H]-oner og isoquinolinderivater.

31.

PARP-inhibitor for anvendelse ifølge krav 30, der PARP-inhibitoren er utvalgt fra gruppen bestående av 2-(4-hydroksyfenyl)benzimidazol-4-karboksamid, 8-hydroksy-2-metylquinazolin-4-[3H]-on; 6(5H)fenantridinon, 3 aminobenzamid; benzimidazol-4-  
5 karboksamider og tricyklisk laktamindoler

32.

PARP-inhibitor for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 27-31, der cancercellene som er defekte i HR er partielt defisiente i HR.

10

33.

PARP-inhibitor for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 27-31, der cancercellene som er defekte i HR er totalt defisiente i HR.

15 34.

PARP-inhibitor for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 27-33, der cancercellene som skal behandles er utvalgt fra gruppen bestående av lunge-, kolon-, pankreas-, mage-, ovarie-, cervikal-, bryst- og prostatacancer.

20 35.

PARP-inhibitor for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 27-34, der cancercellene som skal behandles er en genkoplet arvelig cancercelle.

36.

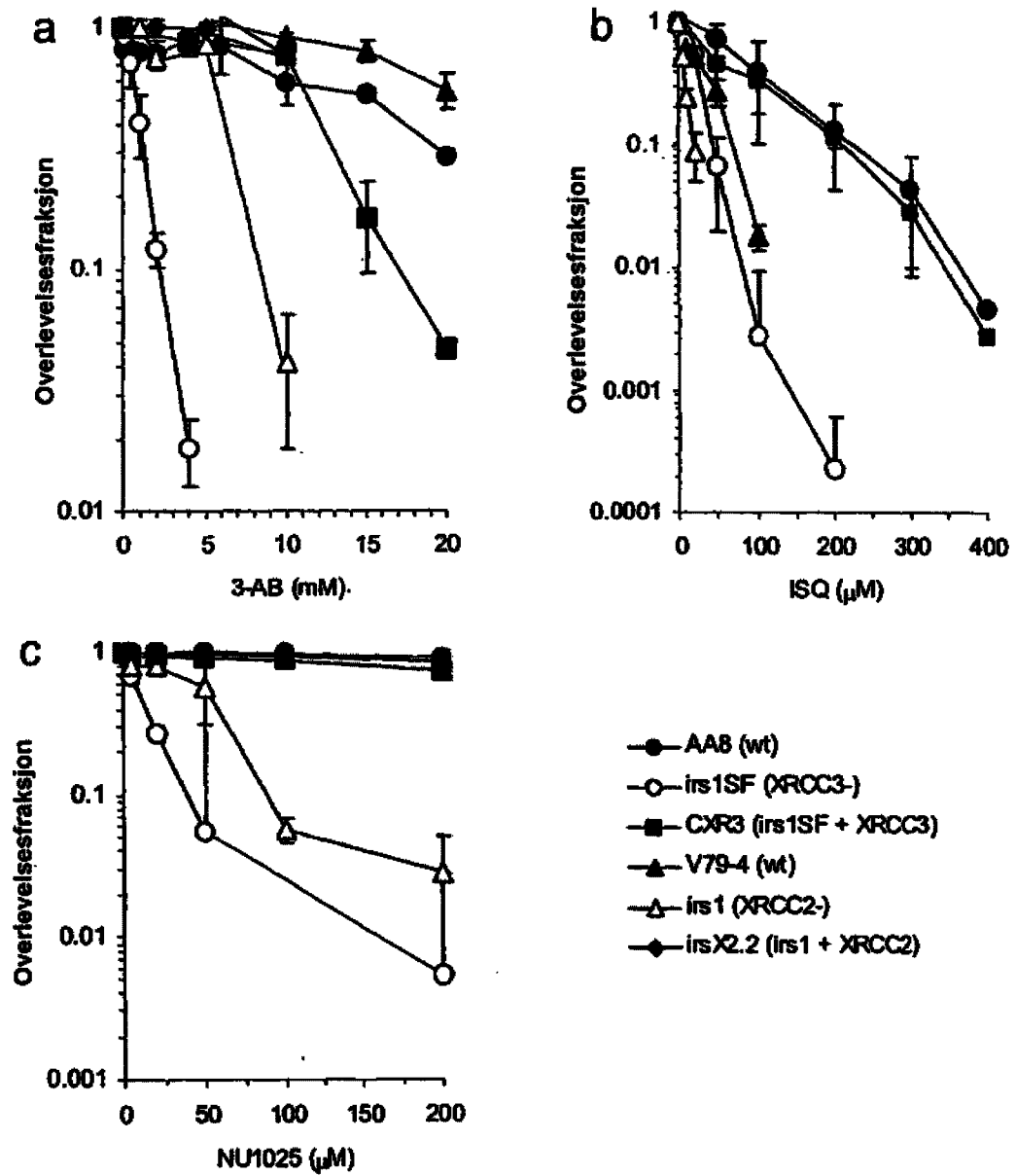
25 PARP-inhibitor for anvendelse ifølge krav 35, der cancercellene som skal behandles er brystcancerceller.

37.

30 PARP-inhibitor for anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 27-36, der cancercellene som skal behandles er defekte med hensyn på BRCA1- eller BRCA2-ekspressjon.

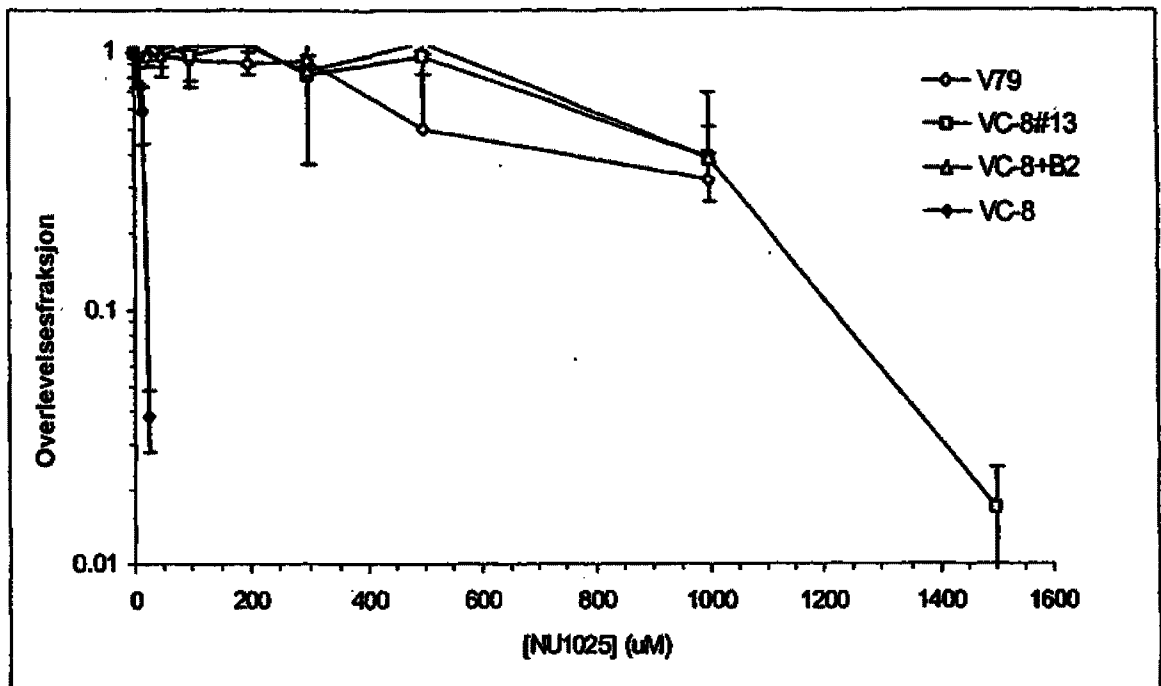
1/20

Figur 1.



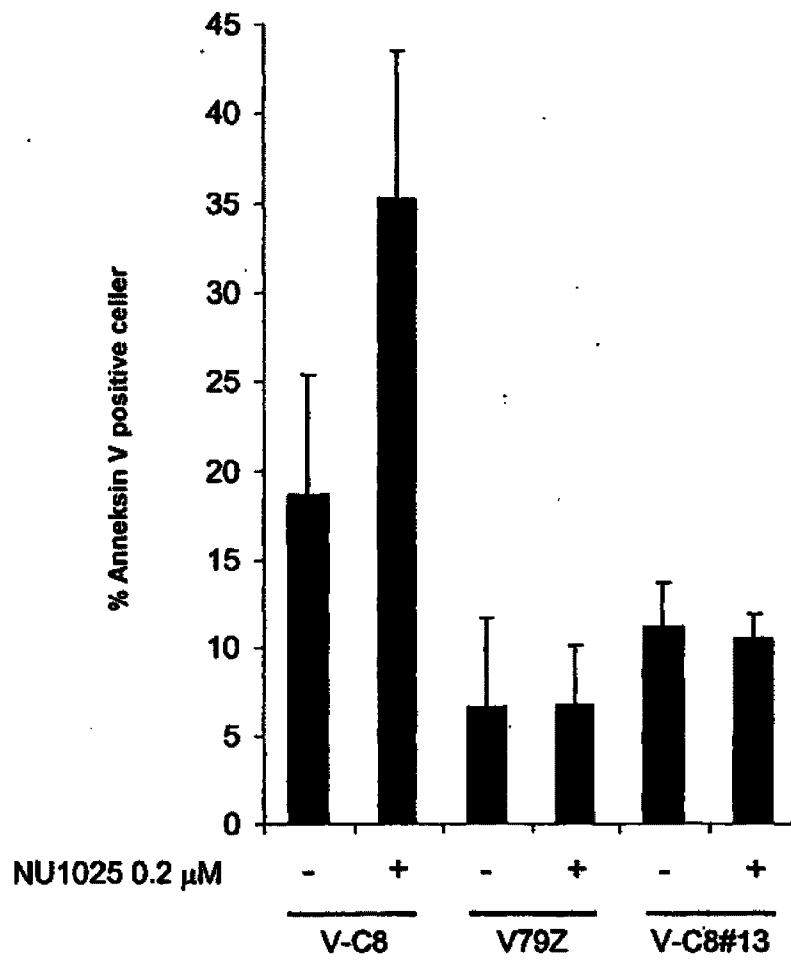
2/20

Figur 2.



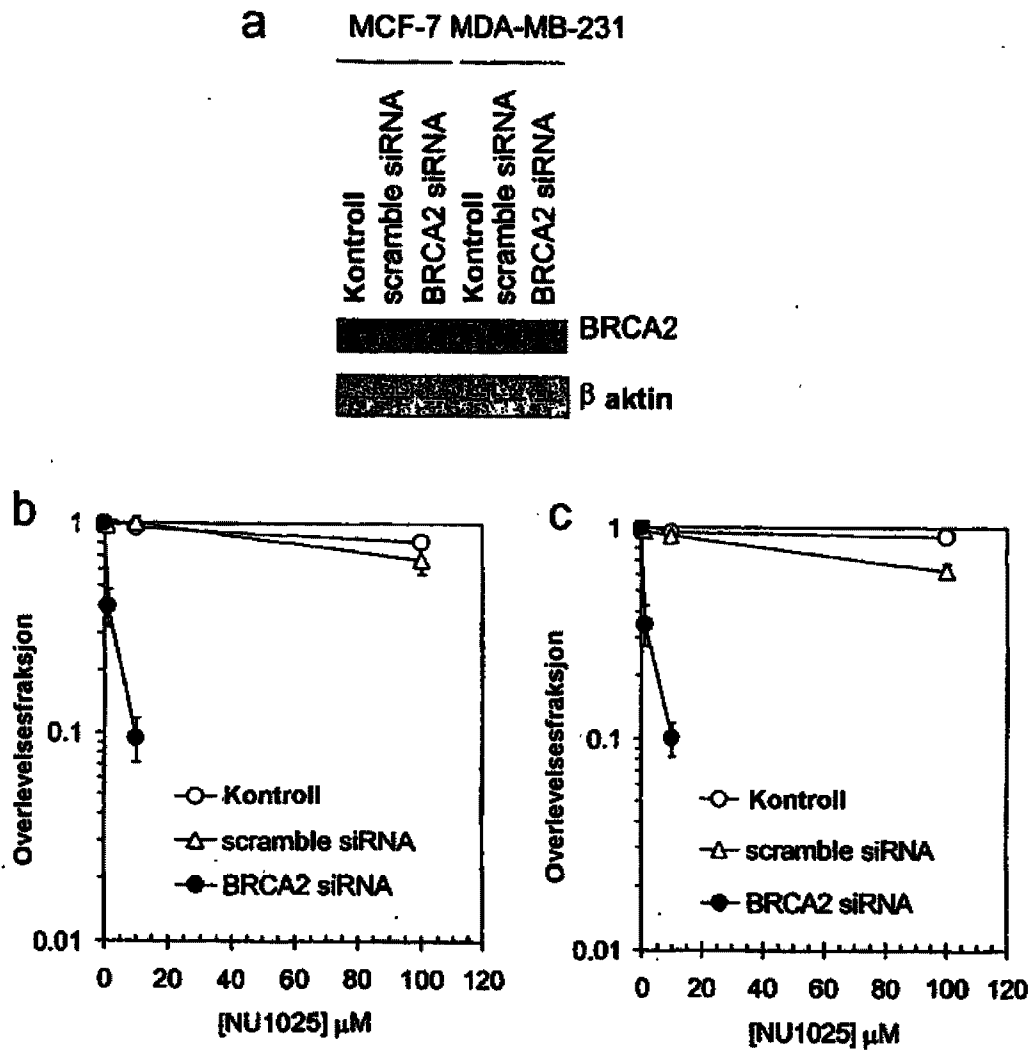
3/20

Figur 3



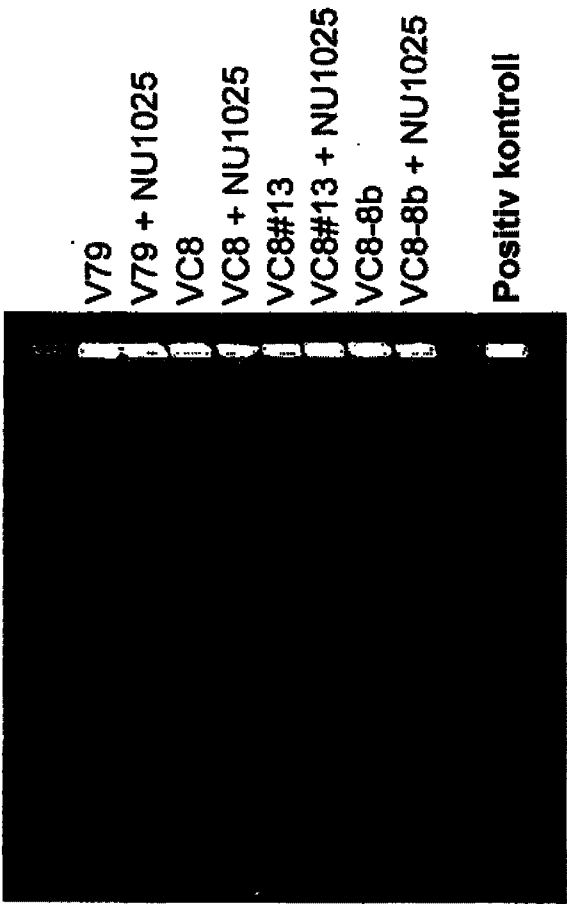
Figur 4

4/20

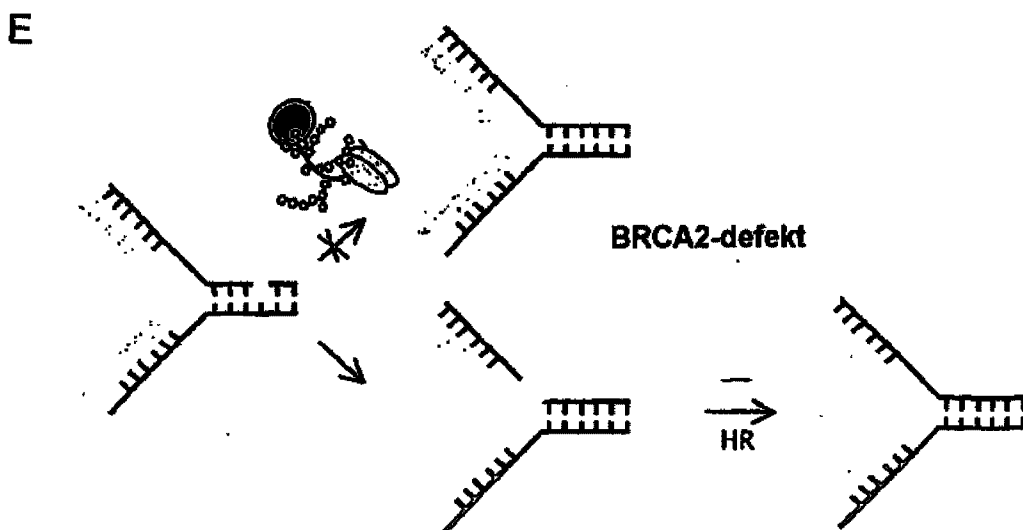
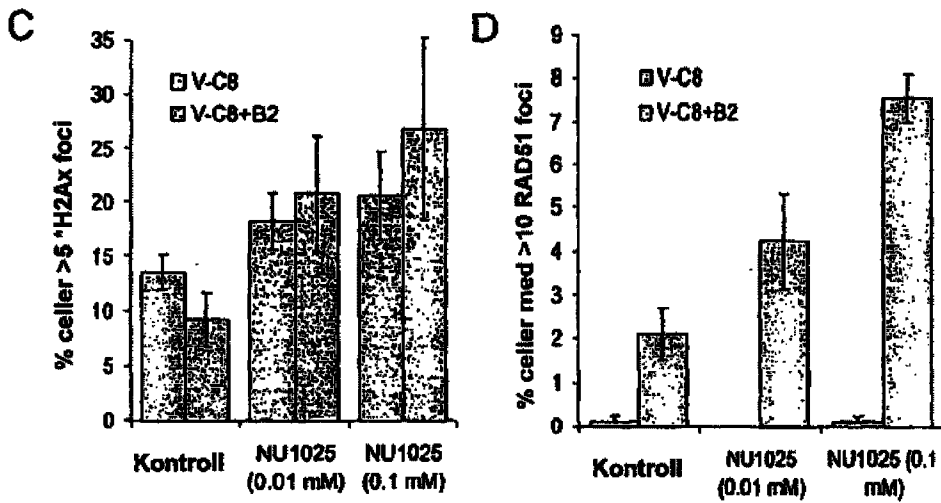
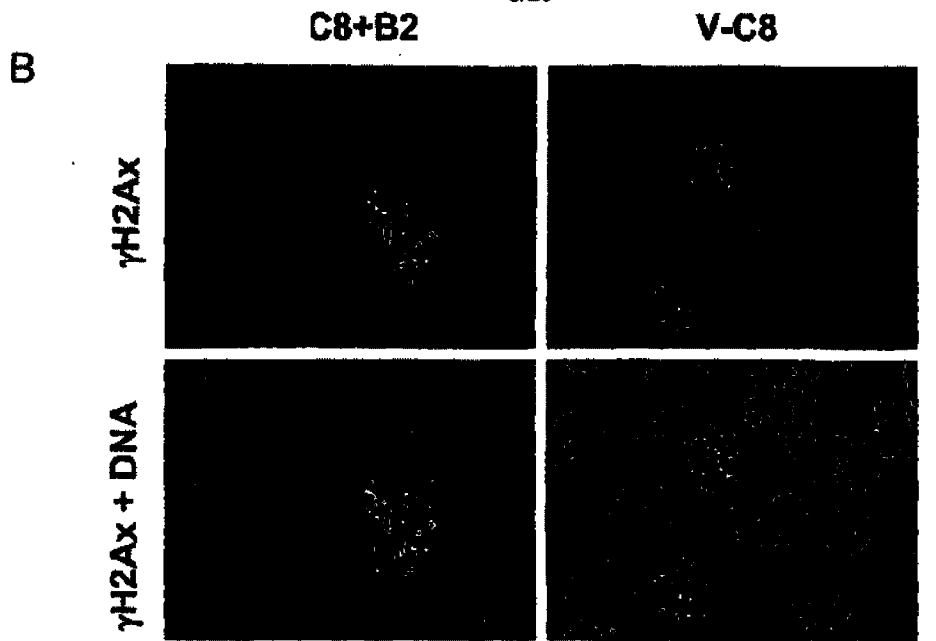


Figur 5A

5/20

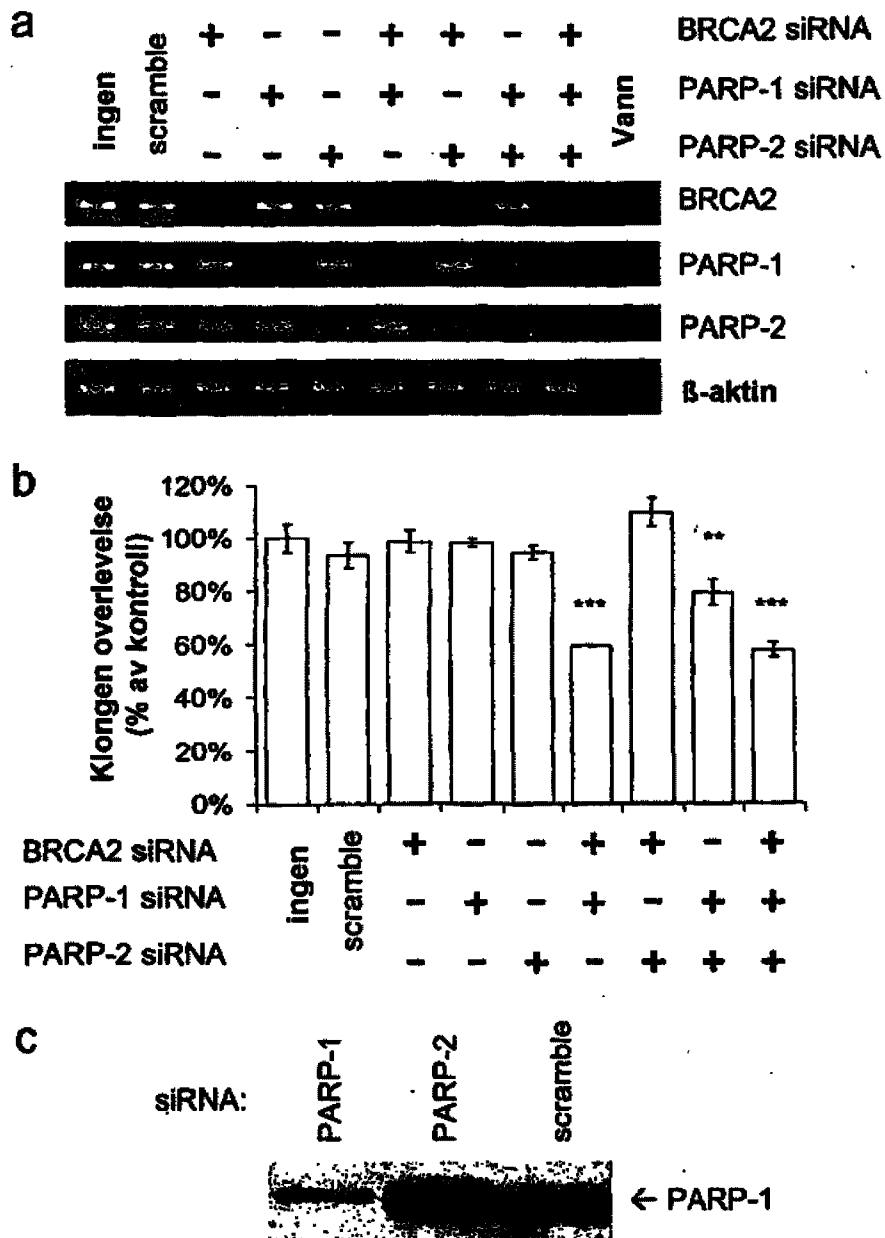


6/20

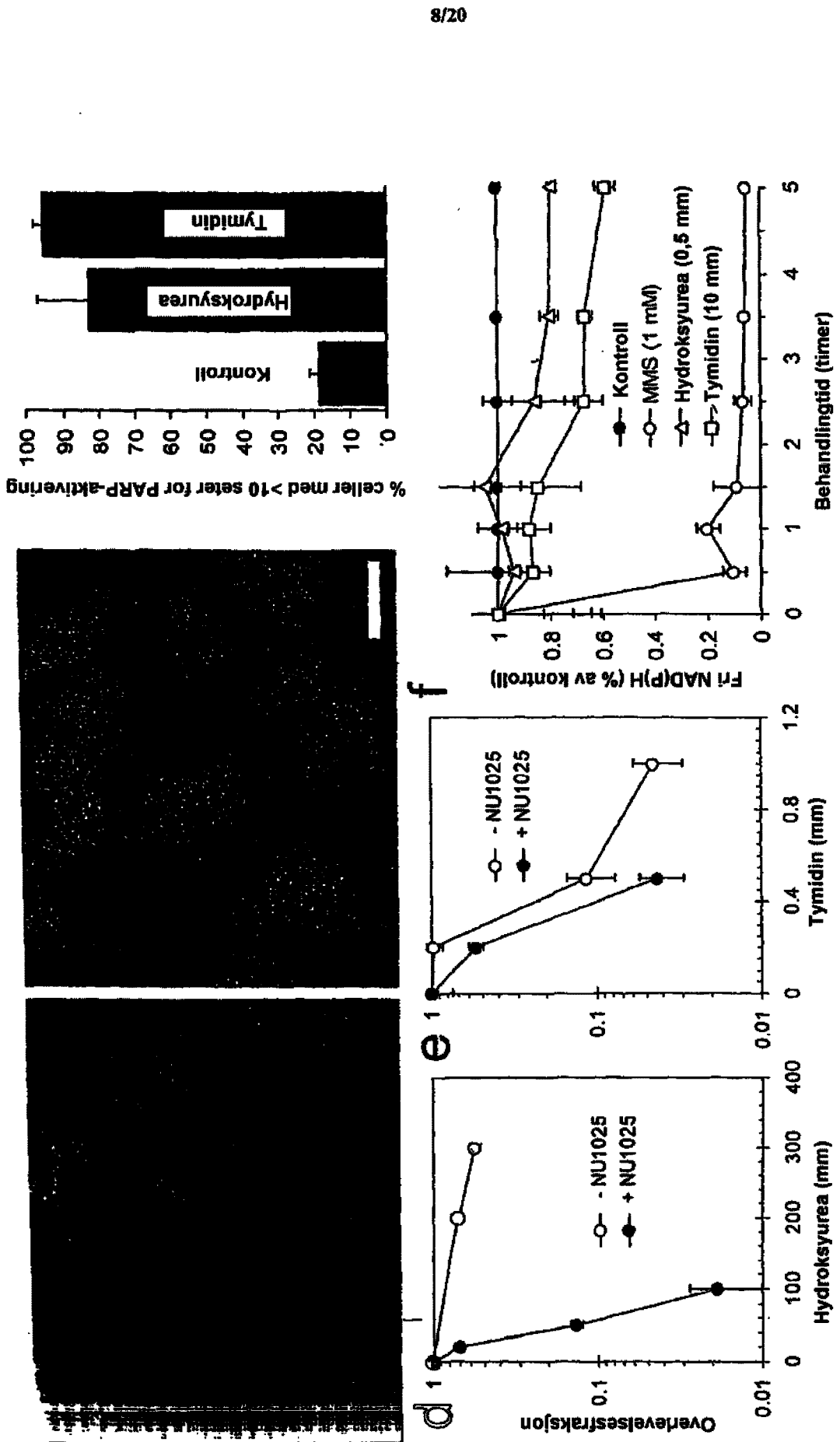


Figur 5B til E

7/20

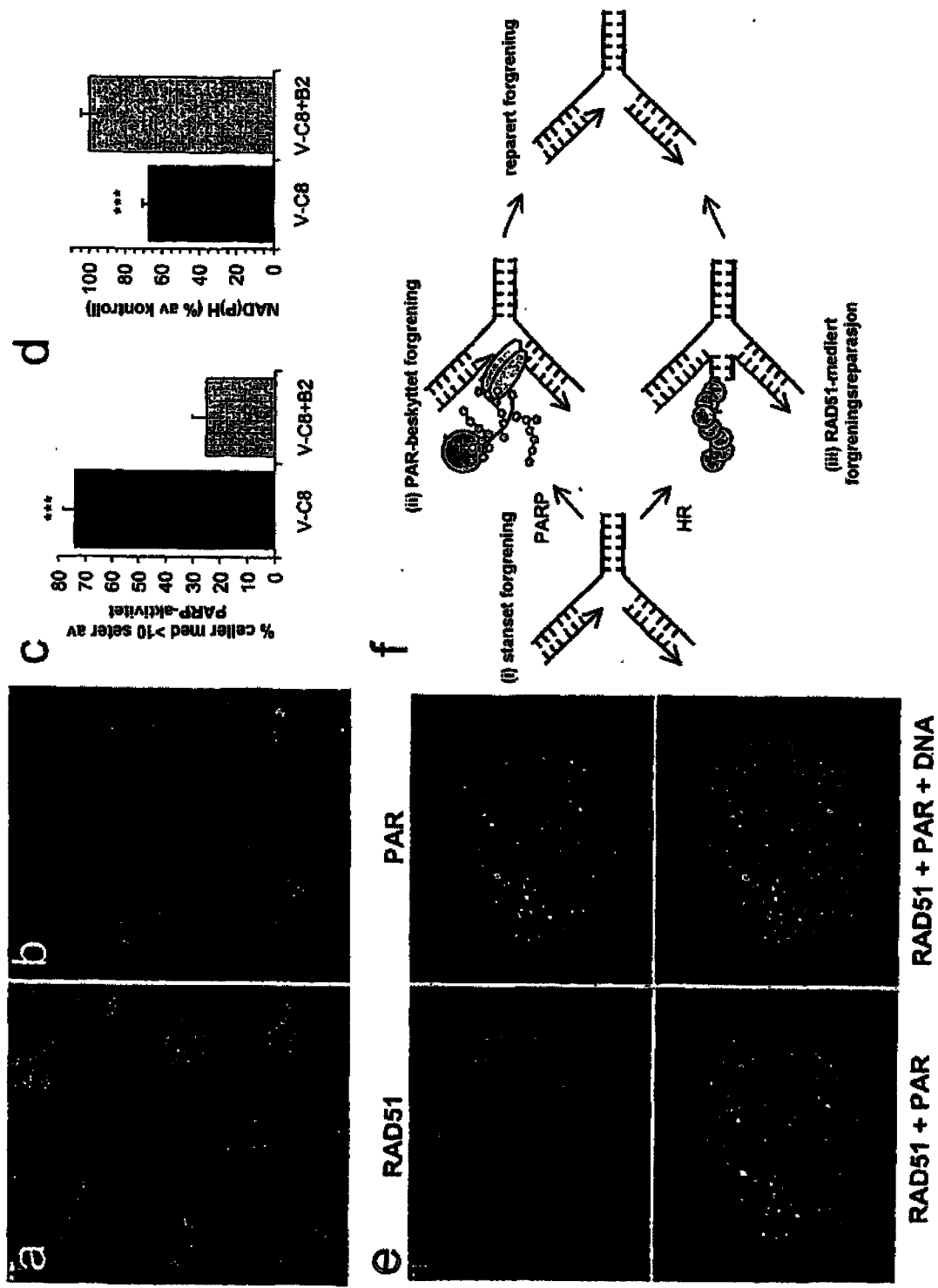


Figur 6



Figur 7

9/20



Figur 8

10/20

FIGUR 9

1 cgccccccca gccccggggg cagggaaagc cttaaattacg gaattaccgc gagcaaggag  
 61 cgcggaatcg gggagcgicc ggagctagct ggatcctcta ggcaggatgg tgatgggaat  
 121 ctttgcaaat tgtatcttct gtttgaaagt gaagtactta cctcagcagc agaagaaaaa  
 181 gctacaaact gacattaagg aaaatggcgg aaagttttcc ttctgftaa atcctcagt  
 241 cacacatata atcttagata atgctgatgt tctgagtcag taccaactga attctatcca  
 301 aaagaaccac gticatattg caaaccaga ttatatatgg aaatctatca gaaaaagag  
 361 actcttggat gtaaagaatt atgatcctta taagccccctg gacatcacac caccctccta  
 421 tcagaaggcg agcagttctg aagtgaanaac agaagggtcta tgcccggaca gtgccacaga  
 481 ggaggaagac actgtggaac tcaactgagtt tggatgcag aatgtgaaa ttctcatct  
 541 tctcaagat ttgaagtig caaaatataa cacttggag aaagtgggaa tggaggagg  
 601 ccaggaagct gtgggtggg agcttcagt ttcgcgggac tcaggggact gtctttctt  
 661 gatctctca cacttctcc tggatgatgg catggagact agaagacagt ttgctataaa  
 721 gaaaacctct gaagatgcaa gtgaatactt tgaanaatc atgaagaac tgaagaaca  
 781 aggatttcta ctgaagaac atttcacacc tgaagcaacc caattagcat ctgaacaatt  
 841 gcaagcattg ctttggagg aagtcatgaa ttcaagcact ctgagccaag aggtgagcga  
 901 tttagtagag atgatttggg cagaggccct gggccacctg gaacacatgc ttctcaagcc  
 961 agtgaacagg attagcctca acgatgtgag caaggcagag gggattctcc ttctagtaa  
 1021 ggcagcactg aaaaatggag aaacagcaga gcaattgcaa aagatgaaga cagagtttta  
 1081 cagactgata cctcacaaag gcacaatgcc caaagaagtg aacctgggac tattggctaa  
 1141 gaaagcagac ctctgccagc taataagaga catggtaat gtctgtgaaa ctatttgc  
 1201 caaaccacac ccacatccc tggccaaata ccgagcttg aggtgcaaaa ttgagcatgt  
 1261 tgaacagaat actgaagaat ttctcagggt tagaaaagag gtttgcaga atcatcacag  
 1321 taagagccca gtggatgtct tgcagatatt tagagttggc agagtgaatg aaaccacaga  
 1381 gttttgagc aaacttggta atgtgaggcc ctgttgcat ggttctctg tacaaaacat  
 1441 cgtgggaatc ttgtctcag gtttgccttt acccaaagta gtggaagatc gtgggtgtgca  
 1501 aagaacagac gtgcgaaacc ttggaagtgg gatttattc agtgattcgc tcagtacaag  
 1561 tatcaagtac tcacaccgg gagagacaga tggcaccaga ctctgtctca ttgtgacgt  
 1621 agccctcggg aagtgtatgg acttatcatga gaaggacttt tcttaactg aagcaccacc  
 1681 aggtctagac agtgtgcatg gatttcaca aacagcctct gtcaccacag actttgagga  
 1741 tgatgaattt gttgtctata aaaccaatca ggttaaaatg aaatatatta ttaaattttc  
 1801 catgcctgga gatcagataa aggactttca tctagtgtat catactgaat tagaggaata  
 1861 cagacctgag tticaaatt tticaaagg tgaagattac cagttaccag atgccaaac  
 1921 ticcagcagc accaaggccg gcctccagga tgccttggg aacttgggtc ctctggagga  
 1981 tgtccacatc aaaggagaa tcatagacac ttagccag gtcattgttt ticagacata  
 2041 cacaataaaa agtcacgtgc ccattgagc aaaaataatc ttctcttgg atgacaaggc  
 2101 cgctgtgtgt ggcttgaag ccttcacaa tgggaagcac atagtggag agaitaaga  
 2161 gaaggagaa gccagcaag agtacctaga agccgtgacc cagggccatg ggccttacct  
 2221 gatgagtcag gatgctccg acgttttac tgaagtgtt ggaacttac cccctaaggc  
 2281 taaggttctt ataaaaatta cctacatcac agaactcagc atcttgggca ctgttggt  
 2341 cttttcatg ccgcccaccg tagcaccctg gcaacaggac aaggcttga atgaaaacct  
 2401 tcaggataca gtagagaaga ttgtataaa agaaatagga acaaagcnaa gcttctctt  
 2461 gactatgtct attgagatgc cgtacgtgat tgaattcatt ttcatgata ctcatgaact  
 2521 gaaacaaaag cgcacagact gaaagctgt cattagcacc atggaaggca gtccttaga  
 2581 cagcagtga ttcttctcc acatcgggtt gtctgctgcc tatctccaa gaatgtgggt  
 2641 tgaanaacat ccagaaaaag aaagcgaggc ttcatgtct gtcttcaac ccgatctga  
 2701 tgtcgacctc cctgacctag ccaatgagag cgaagtgatt attgtcttg actgcicag  
 2761 ttccatggag ggtgtgacat tcttgaagc caaggaaatc gccttgcag cgctgtcctt

11/20

2821 ggtgggtgag aagcagaaag taaatattat ccagttcggc acaggttaca aggagctatt  
 2881 ttcttatcct aagcataca caagcaatac cgcggcagca gagttcatca tctctgccac  
 2941 acctaccatg gggaacacag acttciggaa aacactccga tatcttagct tattgtacc  
 3001 tgcctgaggg tcacggaaca tcctcctggt gctctgatggg cactccagg algagagcct  
 3061 gacattacag ctctggaaga ggagccgcc gcacaccagg ttattcgct gcggtatcgg  
 3121 ttctacagca aatcgtcacg tcttaaggat ttgtccag tctggtgccg gattattga  
 3181 alattttaat gcaaaatcca agcatagtg gagaaaacag atagaagacc aaatgaccag  
 3241 gctatgtct cagagttgcc acctctctc cgtcaaatgg cagcaactca atccagatgc  
 3301 gccgaggcc ctgcaggccc cagcccagg gccatcttg ttgcgaatg atcgactct  
 3361 tctctatgga ttatctctc actgcacaca ggcaactctg tctgcactaa ttcaagaga  
 3421 agaattttgt acaatgggt cgtactctga gcttcagaag acaactggaa ctatgatcca  
 3481 caagctggca gcccgagctc taatcagaga ttatgaagat ggcatcttc acgaaaatga  
 3541 aaccagtcct gagatgaaa acaaacctt gaaatctctg attattaac tcagtaaga  
 3601 aaactctctc ataacacaat ttacaagctt tctggcagtt gagaaaagg algagaatga  
 3661 gtcacctttt cctgatatt caaaagtct tgaacttatt gccaaagaag atgtagactt  
 3721 cctgccctac atgagctggc agggggaacc ccaagaagcc gtcaggaacc agtctcttt  
 3781 agcatcctct gagtggccag aattacgtt atccaaacga aaacatagga aaattccat  
 3841 ttccaaaaga aaatggaat tatctcagcc agaagtctt gaagatttg aagaggatgc  
 3901 cttaggtgta ctaccagctt tcacatcaaa ttggaacgt ggacgtgtg aaaagctatt  
 3961 ggatttaagt tggacagagt catgtaaac aacagcaact gaaccactat ttaagaagt  
 4021 cagtcctatg gaaacatca ctctagctt ttctctatt ttggctccg ccgttggtc  
 4081 ctatcttacc ccgactaccc gogctcacag tctgcttcc ttgtctttg cctcatafcg  
 4141 tcaggtagct agtttcggt cagctgctcc tccagacag ttgatgcat ctcaattcag  
 4201 ccaaggccct gtgcttgca ctgtgctga ctggatcca cagtcggct cttgtccac  
 4261 aggacctccc cagaaccac ctctgcacc ctattgtggc attgtttt cagggagctc  
 4321 attagctct gcacagctc ctccactgca acatcctgga ggcttacta ccagccttc  
 4381 tctggcacc ttccctgagc tggattctcc ccagcttcat tctctctc ctacagacc  
 4441 tgatcccatc agaggtttg ggtctatca tccctctgt tactctctt ttactttca  
 4501 acctccgca gcctcttga ctgccaacct taggtgcca atggcctctg cttaacctga  
 4561 ggctcttgc agtcagctcc ggactacccc agtagatctc tctctctag aagaatcagt  
 4621 aggcagctc gaagggaagc gatgtctgt ctgtctttt caaagtctg acacagaag  
 4681 tgatgagcta tcagaagta ttcaagacag ctgctttta caaataaat gtgatacaa  
 4741 agatgacagt atccctgtct tctggaagt aaaagaagag gatgaaatag tctgcacaca  
 4801 aactggcag gatgtgtgc ctggacaga actctcagt ctacagacag aggatggctt  
 4861 ctggaactt acaccagaac tgggacttat attaatctt aatacaatg gttgcacag  
 4921 ctctttaa caaaaaggca ttcaatctt aggtgtaaaa ggaagagaat gctcctgga  
 4981 cctaattgcc acaatgctg tactacagtt tattgcacc aggttgga aagagggaat  
 5041 agtgttcaa tctatgata aaatggatga cctctctatt tccaggaata ttccctggc  
 5101 tttaggca ataaagcaag caagtgaat ggtaagaaga actgaaggac agtaccatc  
 5161 tatctgcca cggctgaac tggggaacga ctggactct gccaccaagc agtgcctgg  
 5221 actccagccc ataagcagc tctccctct tcatagagc ctccattaca gtaaggcta  
 5281 agtcaaatga aactgaatt taaactttt gcatgctct atgtagaaa taatcaaat  
 5341 ataatagata ctataatga aacttacta aggttactt cagtgtagca attactgtc  
 5401 ttaaaaatta agtgaagaa gaattactt aatcaactaa caagcaataa taaatgaa  
 5461 cttaaat

12/20

Figur 10

1 ctagaattca gcggccgctg aattctaggc ggcgccggcg cgacggagca ccggcggcgg  
 61 caggcgaga gcattaatg aaagcaaaag agttaataat ggcaacacgg ctccagaaga  
 121 ctctccctt gccagaaaa ctctagatg ccagagacag gagicgaaa agatgcctgt  
 181 ggctggagga aaagctaata aggacaggac agaagacaag caagatggta tggcaggaag  
 241 gtatggggc agcaaaaggg tctctgaatc tgggaaggcc ttgctgttaa agggcaaaag  
 301 tctgtggac ccagagtgta cagccaaggt ggggaaggct catgtgtatt gtgaaggaaa  
 361 tgatgtctat gatgtcatgc taaatcagac caatctccag ticaacaaca acaagtacta  
 421 tctgattcag ctattagaag atgatgccc gaggaacttc agtggttggg tgagatgggg  
 481 ccgagttggg aaaatgggac agcacagcct ggtggcttgt tcaggcaatc tcaacaaggc  
 541 caaggaaatc tticagaaga aattccttga caaacgaaa aacaattggg aagatcgaga  
 601 aaagtttgag aaggtgcctg gaaaatatga tatgtacag atggactatg ccaccaatac  
 661 tcaggatgaa gaggaacaa aaaaagagga atctctttaa tctcccttga agccagagtc  
 721 acagctagat cticgggtac aggagttaat aaagttgac tgtaatgttc aggccatgga  
 781 agaatgatg atggaaatga agtataatc caagaagcc ccacttggga agctgacagt  
 841 ggcacaaatc aaggcaggtt accagtcctt taagaagatt gaggattgta ttgggctgg  
 901 ccagcatgga cgagcttca tgggaagcat caatgaattc tacaccagga ttccgcatga  
 961 ctitggactc cgtactcttc cactaatccg gacacagaag gaactgtcag aaaaaatata  
 1021 attactagag gcttggggag acattgaaat tgctattaag ctggtgaaa cagagctaca  
 1081 aagccagaa caccatgg accaactata tagaaaccta catgtgctt tgcgccctt  
 1141 tgaccatgaa agttacgagt tcaaagtat ttccagtac ctacaatcta cccatgctc  
 1201 cacacacagc gactatacca tgaccttctt ggatttgtt gaagtggaga aggatggta  
 1261 gaaagaagcc tticagagagg accttataa caggatgctt ctatggcatg gticcaggat  
 1321 gagtaactgg gtgggaatct tgagccatgg gcttcgaatt gccaccctg aagctccat  
 1381 cacaggttac atgttggga aaggaatcta ctitgtgac atgtcttca agagtggcaa  
 1441 ttactgctt gccctcgc taaagaatac aggactgtg ctcttatcag aggtagctt  
 1501 aggtcagtg aatgaactac tagaggccaa tctaaggcc gaaggattgc ttaaggtaa  
 1561 acatagcacc aaggggctgg gcaagatggc tccagttct gccacttcg tcacctgaa  
 1621 tgggagtaca gtgccattag gaccagcaag tgacacagga attctgaatc cagatggta  
 1681 taccctcaac tacaatgaat atattgtata taacccaac caggtccgta tgcgtacct  
 1741 tttaaaggt cagttaati tcttcagct gtggtgaatg ttgatcttaa ataaaccaga  
 1801 gatctgatct tcaagcaaga aaataagcag tgtgtactt gtgaatttg tgatattta  
 1861 tgaataaaa actgtacagg tctaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa

Figur 11

13/20

1 tgggactggt cgcctgact ggctgcccc agcctctgct tcacccact ggtggccaaa  
 61 tagccgatgt ctaatcccc acacaagctc atccccggcc tctgggattg ttgggaattc  
 121 tctcccta at tcacgctga ggctcatgga gattgctag acctgggact gccctgggag  
 181 gcgcacacaa ccaggccggg tggcagccag gacctctccc atgtccctgc tttcttggc  
 241 calggctcca aagccgaagc cctgggtaca gactgagggc cctgagaaga agaagggccg  
 301 gcaggcagga agggaggagg accccticcg ctccaccgt gaggcctca aggccatacc  
 361 cgcagagaag cgcataatcc gcgtggatcc aacatgtcca ctacagcaga acccgggac  
 421 ccagggtgat gaggactaca actgcaccct gaaccagacc aacatcgaga acaacaacaa  
 481 caagttctac atcatccagc tgcctcaaga cagcaaccgc tttctacct gctggaaccg  
 541 ctggggccgt gtgggagagg tggccagtc aaagatcaac cactcaca ggctagaaga  
 601 tgcaagaag gacttgaga agaaattcg ggaagacc aagaacaact gggcagagc  
 661 ggaccacttt gtgtctacc cgggcaagta cacactatc gaagtacagg cagaggatga  
 721 ggcccaggaa gctgtgtga aggtggacag agggccagt aggacttga ctaagcgggt  
 781 gcagccctgc tccctggacc cagccagca gaagctatc actaacatct tcagcaagga  
 841 gatgtcaag aacaccatgg cctcatgga cctggatgt aagaagatgc ccctgggaaa  
 901 gctgagcaag caacagattg cacggggtt cgaggcctg gaggcgtgg aggaggccct  
 961 gaaaggcccc acgatgggt gccaaagcct ggaggagctg tctcacact ttacaccgt  
 1021 catccgcac aactcggcc acagccagcc ccgcccac aatccctg agcttctga  
 1081 ggccaagaag gacatgtgc tgggtgtgc ggacatcgag ctggcccagg cctgcaggc  
 1141 agtctctgag caggagaaga cggtgaggga ggtgccacac cccctggacc gagactacca  
 1201 gcttctcaag tgccagctgc agctgctaga ctctggagca cctgagtaca aggtgataca  
 1261 gacctactta gaacagactg gcagcaacca caggtgccct acacticaac acatctggaa  
 1321 agtaaaccaa gaaggggagg aagacagatt ccaggccac tccaaactgg gtaatcgaa  
 1381 gctgtgtgg catggacca acatggccgt ggtggccgc atctcacta gtgggtccg  
 1441 catcatgcca catctgtg ggcgtgtg caagggcatc tacttgcct cagagaacag  
 1501 caagtcagct gatatgtta ttggcatga gtgtggggcc caccatgtc gctacatgt  
 1561 cctgggtgag gtggccctg gcagagagca ccatatcaac acggacaacc ccagcttga  
 1621 gagccacct cctggcttc acagtgtcat tggcgaggc cacaccgagc ctgatccgac  
 1681 ccaggacact gattggagc tggatggcca gcaagtgtg gtgcccagg gccagcctg  
 1741 gccctgcca gattcagca gctccacatt ctccagagc gactacctca tctaccagga  
 1801 gagccagtgt cgctgcgt acctgctgga ggtccacct tgagtcccg cctgtcccc  
 1861 cgggtctct caaggtgga ctgtatct caatcatct gccatctct ggtacccta  
 1921 tatcactct ttttcaag aatacaatc gttgtgta actatagta ccatgtgta  
 1981 caagatccct gaacttatgc ctctaactg aaatttga tttttgaca catctgcca  
 2041 gtccctctc tccagcca tggtaaccag catgtgact tttacttga taaggcagc  
 2101 tttataggt tccatgta agtgagatca tgcagtgtt gtcttctgt gcttgctta  
 2161 ttactcag cataatgtc accgggtca ccaatgtt cataaatgac aagatttct  
 2221 ccttaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaa

Figur 12

14/20

|      |             |             |            |            |            |            |
|------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| 1    | cgaagatggc  | ggcgtcgcgt  | cgtctcagc  | atcatcacca | ccatcatcaa | caacagctcc |
| 61   | agcccgcccc  | aggggcttca  | gcgcgcgcgc | cgccacctcc | tccccactc  | agccctggcc |
| 121  | tggccccggg  | gaccacccca  | gcctctccca | cggccagcgg | cctggcccc  | tgcgcctccc |
| 181  | cgcggcacgg  | cctagcgcgt  | ccggaggggg | atggcagtcg | ggatccgccc | gacaggcccc |
| 241  | gattccccga  | cccggttgac  | ggtaccagct | gttgccagta | caccagcaca | atctgtaccg |
| 301  | tcgcgcgcgc  | tcccgtggtc  | ccagcgggtt | ctacttcctc | tgccgctggg | gtcgtcccca |
| 361  | acccagccgg  | cagtggcagt  | aacaattcac | cgtcgtcttc | ttcttccccg | acttcttctt |
| 421  | catcttcttc  | tccatctctc  | cctggatoga | gcttggcgga | gagcccgag  | gcggccggag |
| 481  | ttagcagcac  | agcaccactg  | gggcctgggg | cagcaggacc | tgggacaggg | gtcccagcag |
| 541  | ttagcggggc  | cctacgggaa  | ctgctggagg | cctgtcgcaa | tggggacgtg | tcccgggtaa |
| 601  | agaggctggg  | ggacgcggca  | aacgtaaatg | caaaggacat | ggcggcgccg | aagtcttctc |
| 661  | ccctgcactt  | cgctgcaggt  | tttggaaagg | aggatgttgt | agaacactta | ctacagatgg |
| 721  | gtgctaagt   | ccacgctcgt  | gatgatggag | gtctcatccc | gcttcataat | gctgttctt  |
| 781  | ttggccatgc  | tgaggttgtg  | agtctgttat | tgtgccagg  | agctgatcca | aatgccaggg |
| 841  | ataactggaa  | ctatacacct  | ctgcatgaag | ctgctattaa | agggaaagat | gatgtgtgca |
| 901  | ttgtgctgct  | gcagcacgga  | gctgacccaa | acattcggaa | cactgatggg | aaatcagccc |
| 961  | tggacctggc  | agatccttca  | gcaaaagctg | tccttacagg | tgaatacaag | aaagacgaac |
| 1021 | tcctagaagc  | tgctaggagt  | ggtaataaag | aaaaactaat | ggctttactg | actcctctaa |
| 1081 | atgtgaattg  | ccatgcaagt  | gatggggcaa | agtcgactcc | tttacatcta | gcagcgggct |
| 1141 | acaacagagt  | tcgaatagtt  | cagcttcttc | ttcagcatgg | tgctgatgtt | catgcataag |
| 1201 | acaaagggtg  | acttgtgctt  | cttcataatg | catgttcata | tggacattat | gaagtccacg |
| 1261 | aactgctact  | aaagcatgga  | gcttgtgtta | atgccatgga | tctctggcag | tttactccac |
| 1321 | tgacacgagg  | tgcttccaag  | aaccgtgtag | aagtctgctc | tttgttactt | agccatggcg |
| 1381 | ctgatcctac  | gttagtcaac  | tgccatggca | aaagtgtgtg | ggatatggct | ccaactccgg |
| 1441 | agcttagggg  | gagattgact  | tatgaattta | aaggtcattc | tttactacaa | gcagccagag |
| 1501 | aagcagactt  | agctaaagtt  | aaaaaaacac | tcgctctgga | aatcattaat | ttcaaaacac |
| 1561 | cgcagctctc  | tgaaacagca  | ctgcactgtg | ctgtggcctc | tctgcatccc | aaacgtaaac |
| 1621 | aagtgcacaga | attgttactt  | agaaaaggag | caaatgttaa | tgaaaaaaat | aaagatttca |
| 1681 | tgactcccc   | gcattgttga  | gccgaaagag | cccataatga | tgtcatggaa | gttctgcata |
| 1741 | agcatggcgc  | caagatgaat  | gcactggaca | cccttgggtc | gactgcttgc | catagagcgg |
| 1801 | ccctagcagg  | ccacctgcag  | acctgcccgc | tcctgctgag | ttacggctct | gacccctcca |
| 1861 | tcattctctt  | acaaggcttc  | acagcagcac | agatgggcaa | tgaagcagtg | cagcagattc |
| 1921 | tgagtgtgag  | ttacggctct  | gacccctcca | tcattctctt | acaaggcttc | acagcagcac |
| 1981 | agatgggcaa  | tgaagcagtg  | cagcagattc | tgagtggcca | ttcgtagata | gtgatcttc  |
| 2041 | tacttcagcc  | ttaatgttga  | tcttgagacg | ggaagattta | gaaggaaatc | tatccagcat |
| 2101 | gtcttctact  | tcaacatgaa  | gagtacacct | atacgtactt | ctgatgttga | ttatcgactc |
| 2161 | ttagaggcat  | ctaaagctgg  | agacttggaa | actgtgaagc | aactttgcag | ctctcaaaat |
| 2221 | gtgaattgta  | gagacttaga  | gggcggcgat | tcacgcccc  | tacacttcgc | agcaggctac |
| 2281 | aacagagtac  | acctatacgt  | actctgagt  | ttgattatcg | actcttagag | gcattcagct |
| 2341 | ctggagactt  | ggaaactgtg  | aagcaacttt | gcagctctca | aaatgtgaat | tgtagagact |
| 2401 | tagagggccg  | gcattccacg  | cccttacact | tcgcagcagg | ctacaaccgc | gtgtctgttg |
| 2461 | tagagtacct  | gctacaccac  | gggtgcccag | tcctatgcaa | agacaagggg | ggcttgggtg |
| 2521 | cccttcataa  | tgcttgttca  | tatggacact | atgaggtggc | tgagctttta | gtaaggcatg |
| 2581 | gggcttctgt  | caatgtggcg  | gacttatgga | aatttacccc | tctccatgaa | gcagcagcta |
| 2641 | aaggaaagta  | tgaatctctc  | aagctccttt | taaaacatgg | agcagatcca | actaaaaga  |
| 2701 | acagagatgg  | aaatacacct  | ttggatttgg | taaagggaag | agacacagat | attcaggact |
| 2761 | tactgaaagg  | ggatgctgct  | ttgttggatg | ctgccaagaa | gggctgcctg | gcaagagtgc |
| 2821 | agaagctctg  | taccccagag  | aatatcaact | gcagagacac | ccagggcaga | aattcaacct |
| 2881 | ctctgcacct  | ggcagcaggc  | tataataacc | tggaaagtag | tgaatatctt | ctagagcag  |
| 2941 | gagctgatgt  | taatgcccag  | gacaagggtg | gtttaattcc | tcttcataat | goggcatctt |
| 3001 | atgggcatgt  | tgacatagcg  | gctttattga | taaaatacaa | caogtgtgta | aatgcaacag |
| 3061 | ataagtgggc  | gtttactccc  | ctccatgaag | cagcccagaa | aggaaggacg | cagctgtgcg |
| 3121 | ccctctctct  | agcgcagtggt | gcagacccca | ccatgaagaa | ccaggaaggc | cagcgcctc  |
| 3181 | tggatctggc  | aacagctgac  | gatatcagag | ctttgctgat | agatgccatg | ccccagagg  |
| 3241 | ccttacctac  | ctgtttttaa  | cctcaggcta | ctgtagtggg | tgctctctcg | atctcaccag |
| 3301 | catccacccc  | ctcctgcctc  | tcggctgcca | gcagcataga | caacctcact | ggccctttag |
| 3361 | cagagtgggc  | cgtaggagga  | gcctccaatg | caggggatgg | cgcgcgggga | acagaaagga |
| 3421 | aggaaggaga  | agttgctggg  | cttgacatga | atatcagcca | atttctaaaa | agccttggcc |
| 3481 | ttgaacacct  | tcgggataat  | tttgaacacg | aacagattac | actagatgtg | ttggctgata |
| 3541 | tgggtcatga  | agagttgaaa  | gaaataggca | tcaatgcata | tgggcacgcg | cacaaattaa |
| 3601 | tcaaaggagt  | agaaagactc  | ttaggtggac | aacaaggcac | caatccttat | ttgacttttc |
| 3661 | actgtgttaa  | tcagggaacg  | atgttgcctg | atcttgcctc | agaagataaa | gaatatcagt |
| 3721 | cagtggaaag  | agagatgcaa  | agtactattc | gagaacacag | agatgggtgg | aatgtggcg  |
| 3781 | gcattctcaa  | cagatacaat  | gtcattcgaa | ttcaaaaagt | tgtaacaaga | aggttgaggg |
| 3841 | agcgggtctg  | ccaccgacag  | aagggaagtg | ctgaggagaa | tcacaacat  | cacaatgagc |

15/20

```

3901 gcatgttggt tcatgggtct cctttcatta atgccattat tcataaaggg tttgatgagc
3961 gacatgcata cataggagga atgtttgggg ccgggattta ttttgctgaa aactcctcaa
4021 aaagcaacca atatgtttat ggaattggag gaggaacagg ctgocctaca cacaaggaca
4081 ggtcatgcta tatatgtcac agacaaatgc tcttctgtag agtgacctt gggaaatcct
4141 ttctgcagtt tagcaccatg aaaatggccc acgcgcctcc agggcaccac tcagtcattg
4201 gtagaccgag cgtcaatggg ctggcatatg ctgaatatgt catctacaga ggagaacagg
4261 cataccaga gtatcttatt actaccaga tcatgaagcc agaagccct tcccagaccg
4321 caacagccgc agagcagaag acctagttaa tgctgctgg tgaaggccag atcagatttc
4381 aacctgggac tggattacag aggattgttt ctaataacaa catcaatatt ctagaagtcc
4441 ctgacagcct agaaataagc tgtttgtctt ctataaagca ttgctatagt g

```

Figur 13

1 cgcgcgcct cgtagccga aacctgccca gccgggtgcc gccactgcg cagcgcggg  
 61 acgacgtcac gtgcgtcccc ggggctggac ggagctggca ggaggggcct tccagcttc  
 121 cgccgcgcg tctttcagg acccggacgg cggattcgcg ctgcctccgc cgcgcgggg  
 181 cagccggggg gcagggagcc cagcgagggg cgcgcgtggg cgcggccatg ggactgcgc  
 241 ggatccggtg acagcagga gccaaagcggc cggggccctg agcgcgtctt ctccggggg  
 301 cctgccttc ctgctcggg ggccggggct cctgctccgg ttgctggcgc tgttctggc  
 361 tctggcggcg gccaggatca tctcgggtcg ccgtgcgcgc gccgggggag cggcctgcgc  
 421 gagcgcgcg gccgaggccg tggagccggc cggccgagag ctgttcgagg cgtgccgcaa  
 481 cggggacgtg gaacgagta agaggctgtt gacgcctgag aaggtgaaca gccgcgacac  
 541 ggccggcagg aatccaccc cgtgcactt cggcgagggt ttggggcgga aagacgtat  
 601 tgaatattg cttagaatg gtgcaaatg ccaagcacgt gatgatggg gccattatcc  
 661 tctcataat gcatgctctt ttggtatgc tgaagtatg aatctctt tgcgacatg  
 721 tgcagacccc aatgctcag ataattgaa ttatctct ctccatgaag ctgcaattaa  
 781 aggaagatt gatgttgca ttgtctgtt acagcatga gctgagccaa ccatccgaaa  
 841 tacagatga aggacagcat tggattagc agatccatct gccaaagcag tgcctactgg  
 901 tgaataaag aaagatgaac tcttagaaag tgcaggagt ggcaatgaag aaaaaatga  
 961 ggctctact acaccattaa atgtcaactg ccacgcaagt galggcagaa agtcaactcc  
 1021 attacattg gcagcaggat ataacagagt aaagattga cagctgttac tgcaacaagg  
 1081 agctgatgc catgctaaag ataaaggta tctggtacca ttacacaatg cctgtctta  
 1141 tggctattat gaagtaactg aacttttgg caagcatggt gccgtgttaa atgcaatgga  
 1201 ctgttgcaa ttcactctc ttatgaggg agcttctaag aacaggggtg aagtatgtc  
 1261 tcttcttta agttatggt cagacccaac actgtcaat tgtcacaata aaagtgtat  
 1321 agacttggt cccacaccac agttaaaga aagattagca tatgaattt aagccactc  
 1381 gtgtgtcaa gctgcacgag aagctgatg tactgaatc aaaaacatc tctcttgga  
 1441 aatggtgaat ttcaagcatc ctcaaacaca tgaacagca ttgcatgtg ctgctgcatc  
 1501 tccatatccc aaaagaaagc aatatgtga actgttgcta agaaaaggag caaacatcaa  
 1561 tgaagagact aaagaattct tgaactctt gcacgtggca tctgagaaag ctcataatga  
 1621 ttttttgaa gtatgtgtga aacatgaagc aaaggtaat gctctggata atcttggtca  
 1681 gacttctta cacagagctg catatttgg tcatctacaa acctgccgc tactcttag  
 1741 ctatgggtgt gatctaaca ttatatccct tcagggttt actgcttac agatgggaaa  
 1801 tgaatgtga cagcaactcc tccaagagg tatctatta ggtaattcag aggcagacag  
 1861 acaattgtg gaagctgcaa aggttgaga tctgaact gtaaaaaac tgtgtactgt  
 1921 tcagagtgc aactgcagag acattgaagg gcgtcagtct acaccactt atttgcagc  
 1981 tgggtataac agagtgtccg tgggtgaata tctgtacag catggagctg atgtgcatg  
 2041 taaagataaa ggaggcctg taccttgca caatgcatg tcttatggac attatgaagt  
 2101 tgcagaactt ctgttaaac atggagcagt agttaatga gctgattat ggaaattac  
 2161 acctttacat gaagcagcag caaaaggaaa atatgaatt tgcaaacctc tgcctcagca  
 2221 tgggtcagac cctacaaaaa aaaacaggga tggaaatact cctttggatc ttgttaaga  
 2281 tggagataca gatattcaag atctgcttag gggagatgca gctttgtag atgctgcaa  
 2341 gaagggtgt ttagccagag tgaagaagt gtcttctct galaatgtaa attgcgcga  
 2401 taccacaggc agacattcaa cactttaca tttagcagt ggttataata attagaagt  
 2461 tgcagagtat ttgtacaac acggagctga tgtgaatgcc caagacaaag gaggacttat  
 2521 tctttacat aatgcagcat ctacgggca ttagatgta gcagcttac taataagta  
 2581 taatgcatgt gtaatgcca cggacaaatg gctttaca ctttgacg aagcagccca  
 2641 aaagggaaga acacagctt gtgcttggg gctagccat ggagctgacc cgactttaa  
 2701 aatcaggaa ggacaaacac cttagattt agtticagca gatgatgca gcgtctct  
 2761 gacagcagcc atgccccat ctgctgccc ctctgttac aagcctcaag tgcataatg

17/20

2821 tgtgagaagc ccaggagcca ctgcagatgc tctctcttca ggtccatcta gcccatcaag  
 2881 ccttctgca gccagcagtc ttgacaactt atcigggagt tticagaac tgccttcagt  
 2941 agttagtica agtggacag aggggtgttc cagttggag aaaaaggagg ttccaggagt  
 3001 agattttagc ataactcaat tctgaaggaa tcttgactt gacaccta taaggatatt  
 3061 tgagagagaa cagatcactt tggatgtatt agttgagatg gggcacaagg agctgaagga  
 3121 gatttgaatc aatgcttatg gacataggca caaactaatt aaaggagtcg agagacttat  
 3181 ctccggacaa caaggcttta acccataatt aactttgaac acctctgta gtggaacaat  
 3241 tcttatagat ctgtctctg atgataaaga gtctcagct gtggaggaag agatgcaag  
 3301 tacagttcga gacacagag atggaggica tgcagggtga atcttcaaca gatacaatat  
 3361 tctcaagatt cagaagggtt gtaacaagaa actatgggaa agatacactc accggagaaa  
 3421 agaagtttct gaagaaaacc acaacctgc caatgaacga atgctatttc atgggtctcc  
 3481 ttttgtgaat gcaattatcc acaaggctt tcatgaaagg catgcgtaca taggttggtat  
 3541 gtttggagct ggcatttatt ttgtgaaaa ctcttccaaa agcaatcaat atgtatatgg  
 3601 aattggagga ggtactgggt gtccagtcca caaagacaga tctgttaca ttgccacag  
 3661 gcagctgctc ttttccggg taaccttggg aaagcttctc ctgcagtcca gtgcaatgaa  
 3721 aatggacatc tctctccag gtcacactc agtcactggt aggccagtg taaatggcct  
 3781 agcattagct gaatatgta ttacagagg agaacaggt tctctgagt attaatlac  
 3841 ttaccagatt atgaggcctg aagggtatgt cgtatgataa atagtattt taagaaacta  
 3901 attccactga acctaaaac atcaaacgag cagtggcctc tacgtttac tcttgcctg  
 3961 aaaaaaaatc atctgccc caggcctgtg gcaaaaggat aaaaatgta acgaagtta  
 4021 acattctgac ttgataaagc ttaataatg tacagtgtt tctaaatatt tctgtttt  
 4081 tcagcactt aacagatgcc attccaggt aaactgggt gtctgtacta aattalaac  
 4141 agagttaact tgaaccttt atattgtatg cattgattct aacaaactgt aatgccctca  
 4201 acagaactaa ttactaat acaactctgt gtctttaa acacagcatt tacactgaat  
 4261 acaattcat ttgtaaaact gtaataaga gctttgtac tagccagta ttatttaca  
 4321 ttgctttgta atataaatct gtttagaac tgcagcgggt taaaaatt ttcatatgt  
 4381 attgttcatc tacttcat ctacatcgt catgattgag tcatcttac attgattcc  
 4441 agaggctatg ttcagttgtt agtgggaaa gatgagta tcagattaa ttgccgatg  
 4501 ggagccttta tctgtatta gaaatcttc tctttaaga actatgaat atgctgaaga  
 4561 ttaatttgt gataccttg tatgtatgag acacattcca aagagctcta actatgatg  
 4621 gtctgatta ctaagaagc ttcttactg gctcaatt ctacttca tgttgaaaa  
 4681 tttctgcag tctctctg aaaattagag caaagtgc ctgtttta gagaaactaa  
 4741 atctgtctg tgaacaatta ttgtgtct ttcatggaac ataagtagga tgttaacatt  
 4801 tccagggtgg gaagggtaat cctaaatcat ttccaatct attctaata ccttaaatct  
 4861 aaaggggaaa aaaaaatca caaacaggac tgggtagtt ttatcctaa gtatatttt  
 4921 tctgttct ttacttgt ttattgctg tatttatagc caatctatc atcatgggt  
 4981 aacttaacc agaactataa aatgtatgt tticagtc cticaggcct cctgaatggg  
 5041 caagtgcagt gaaacagggt ctctctgctc ctgggtttc tctcatgat gttatgccc  
 5101 attggaata tctgtcagt ttgtcacca tatgtgacc acgctgtgc tcatgttggc  
 5161 agctatagaa ggaaatgctg tccataaaa tggcatccct atttcaata taacactct  
 5221 ttccaggaag catgttaag catctgtta cagagacata catccattat ggttggcaa  
 5281 tctctttat ttgtgact tagctccct caaagtcgag gaaagatct tactactta  
 5341 atgaggacat tcccatcac tctctgtacc agttacctt tatttactg ttattcagt  
 5401 ctgtaatta actggccct tgcagtaact tgtacataa gtgctagaaa atcatgttc  
 5461 ttgtcctgag taagagttaa tcagagtaag tgcattctg gattgttct tgtatgtaa  
 5521 attatgata ttatttga agtcaaatcc tcatctgaa gtgtttta tacagctct  
 5581 taataattac aaatatcca aagtcattc ttggaacaca agtggagtat gccaaattt  
 5641 atatgaatt ttacagatt ctaagcttc aggtttata attagaagat aatgagagaa  
 5701 ttaatgggt ttatttact attatctct aactatgtg ccatattac taccctatg  
 5761 agtgaatctg gaattgctt tcatgtgaaa tcatgtgt ctatpagtt acaactctg

18/20

5821 aaactgtgtt attttatcta aaccattgct taatgagigt gtttttccat gaatgaatat  
5881 accgtgggtc atatgttagc atggcagcat tticagatag ctttttgitt gttgggaagt  
5941 tgggggtttg gggggagggg gagtattagt acgttgcatt gaatagccta ctttataatg  
6001 atgggaatgc tttttctttt gttttgggat tttttttt gaagtgaat ttaactttt  
6061 gtgccagtag tactattata cccatcttca gtgtcttact tgtactgtat caaatccat  
6121 accctcattt aattctaat aaaactgtc actgtaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa  
6181 aaaaaaaaaa

19/20

Figur 14

1 cccccccca gccccggggg cagggaaagc ctaaattacg gaattaccgc gagcaaggag  
 61 cgcggaatcg gggagcgicc ggagctagct ggatccicta ggcaggatgg tgaigggaat  
 121 ctttgcaaat tgtatcttct gttigaaagt gaagiactta cctcagcagc agaagaaaaa  
 181 gctacaaact gacattaagg aaaatggcgg aaagtttcc ttctgftaa atcctcagtg  
 241 cacacatata atcttagata atgctgatgt tctgagtcag taccaactga attctatcca  
 301 aaagaaccac gticatatig caaaccaga ttttatatgg aaatctatca gagaaaagag  
 361 actcttggat gtaaagaatt atgacctta taagccccctg gacatcacac cacctcciga  
 421 tcagaaggcg agcagttctg aagtgaanaa agaaggicta tccccggaca gtgccacaga  
 481 ggaggaagac actgiggaaac tcaactgagti tggatgcag aatgttgaaa ttctcatct  
 541 tctcaagat ttgaagttg caaaatataa caccttggag aaagtgggaa tggagggagg  
 601 ccaggaagct gtggtggttg agcttcagtg ttcgcgggac tccagggaact gtcctttct  
 661 gatctctca cacttctcc tggatgatgg catggagact agaagacagt ttgctataaa  
 721 gaaaacctct gaagatgcaa gtgaatactt tgaataaac attgaagaac tgaagaaca  
 781 aggatttcta ctaagagaac attcacacc tgaagcaacc caattagcat ctgaacaatt  
 841 gcaagcatig ctttggagg aagtcatgaa ticaagcact ctgagccaag aggtgagcga  
 901 ttagtagag atgatttggg cagaggccct gggccaccig gaacacatgc ttctcaagcc  
 961 agtgaacagg attagcctca acgatgtgag caaggcagag gggattctcc ttctagtaaa  
 1021 ggcagcactg aaaaatggag aaacagcaga gcaattgcaa aagatgatga cagagtttta  
 1081 cagactgata cctcacaag gcacaatgcc caaagaagtg aacctgggac tattggctaa  
 1141 gaaagcagac ctctgccage taataagaga catggttaat gtctgtgaaa ctaattgtc  
 1201 caaaccacac ccaccatccc tggccaaata ccgagcttgg aggtgcaaaa ttgagcatgt  
 1261 tgaacagaat actgaagaat ttctcagggt tagaaaagag gttitgcaga atcatcacag  
 1321 taagagccca gtggatgtct tgcagatatt tagagttggc agagtgaatg aaaccacaga  
 1381 gttttgagc aaacttggta atgtgaggcc ctgtgtcat ggttctcctg tacaaaacat  
 1441 cgtgggaatc ttgtgtcag ggtgtcttt acccaaagta gtggaagatc gtggtgtgca  
 1501 aagaacagac gtcggaacc ttggaagtgg gatttattc agtgattcgc tcagtacaag  
 1561 tatcaagatc tcacaccgg gagagacaga tggcaccaga ctctgtctca ttgtgacgt  
 1621 agccctcgga aagtgtatgg acttacaiga gaaggacttt cccttaactg aagcaccacc  
 1681 aggtctagac agtgtgcatg gattticaca aacagcctct gtcaccacag actttgagga  
 1741 tgatgaattt gttgtctata aaaccaatca ggtiaaaatg aaatatatta taaattttc  
 1801 catgcctgga gatcagataa aggactttca tcttagtgat catactgaat tagaggaata  
 1861 cagacctgag ttitcaaat tticaaagg tgaagattac cagtaccag atgccaanaa  
 1921 ttccagcagc accaaggccg gcctccagga tgcctctggg aacttgggtc ctctggagga  
 1981 tgtccacatc aaaggagaa tcatagacac ttagcccag gtcattgttt ttacacata  
 2041 cacaataaaa agtcacgtgc caattgagc aaaatataat ttcttttg atgacaaggc  
 2101 cgctgtgtgt ggcttcgaag ccttcatca tgggaagcac atagtggag agattaaaga  
 2161 gaaggaagaa gccagcaag agtacctaga agccgtgacc cagggccatg gcgcttacct  
 2221 gatgagtcag gatgtccgg acgtttttac tgtaagtgtt ggaacttac cccctaaggc  
 2281 taaggttctt ataaaaatta cctacatcac agaactcagc atcctgggca ctgttggtgt  
 2341 cttttcatg cccgccaccg tagcaccctg gcaacaggac aaggcttga atgaaaacct  
 2401 tcaggataca gtagagaaga ttgtataaa agaaatagga acaaagcaaa gcttctcttt  
 2461 gactatgtct attgagatgc cgtatgtat tgaattcatt ttacgtgata cacatgaact  
 2521 gaaacaaaag cgcacagact gcaagctgt cattagcacc atggaaggca gtccttaga  
 2581 cagcagtgga ttctctcc acatcgggtt gtctgtgcc tatctccaa gaatgtgggt  
 2641 tgaanaacat ccagaaaaag aaagcgaggc ttgatgctt gcttttaac ccgatctga  
 2701 gtgcaccic cctgacctag ccagtgaag cgaagtgtt attgtcttg actgtccag

20/20

2761 ttccatggag ggtgtgacat tcttgaagc caagcaaatc accttgcatt cgctgtcctt  
 2821 ggtgggtgag aagcagaaag taaatattat ccagttcggc acaggttaca aggagctatt  
 2881 ttctatcct aagcataca caagcaatac cacggcagca gatttcaica tcttgcac  
 2941 acctaccatg gggaacacag acttctggaa aacactccga tatcttagct tattgtacc  
 3001 tgctcgaggg tcacggaaca tcttctggt gctgatggg cactccagg atgagagcct  
 3061 gacattacag ctctgaaga ggagccgcc gcacaccagg ttattgcct gcggtatcgg  
 3121 ttctacagca aatcgtcacg tcttaaggat ttgtccag tgggtgccg gattattga  
 3181 atattttaat gcaaatcca agcatagtig gaaaaacag atagaagacc aatgaccag  
 3241 gctatgttct ccgattgcc actctgtctc cgtcaaatgg cagcaactca atccagatgc  
 3301 gcccagggcc ctgcaggccc cagcccagggt gccatccttg ttgcgaatg atcgactcct  
 3361 tgtctatgga ttattcctc actgcacaca agcaactctg tgtgcactaa ttaagagaa  
 3421 agaatttgt acaatgggtg cgactactga gcttcagaag acaactggaa ctatgatcca  
 3481 caagctggca gcccgagctc taatcagaga ttatgaagat ggcattcttc acgaaaatga  
 3541 aaccagtcct gagatgaaa acaaacctt gaaatctctg attattaac tcagtaaga  
 3601 aaactctctc ataacacaat ttacaagctt tgtggcagtt gaaaaaggg atgagaatga  
 3661 gtgcctttt cctgatattc caaaagtgc tgaacttatt gccaaagaag atgtagactt  
 3721 cctgcctac atgagctggc agggggagcc ccaagaagcc gtcaggaacc agtctcttt  
 3781 agcatcctct gattggccag aattacgtt atccaaacga aaacatagga aaattccatt  
 3841 ttccaaaaga aaaatggaat tatcagacc agaagtctt gaagatttg aagaggatgg  
 3901 cttaggtgta ctaccagctt tcacatcaa ttggaacgt ggaggtgtgg aaaagctatt  
 3961 ggaattaatg tggacagagt catgtaaac aacagcaaci gaaccactat ttaagaaatg  
 4021 cagtccatgg gaaacatcta ctctagctt ttctctatt ttggctccgg ccgttggtc  
 4081 ctatcttacc ccgactacc gcgtcacag tctgtctcc ttgtctttg cctcatatg  
 4141 tcaggtagct agtttcggtt cagctgtcc tccagacag ttgatgcat ctcaattcag  
 4201 ccaaggccct gtgcctggca ctgtgtga ctggatcca cgtcggcgt ctgtccac  
 4261 aggaacctcc cagaaccac ctctgcacc ctatgtggc attgtttt caggagctc  
 4321 attagctct gcacagctg ctccactga acatctgga ggtttacta ccagccctc  
 4381 tgctggcacc ttccctgagc tggattcct ccagctcat ttctcttc ctacagacc  
 4441 tgatcccatc agaggtttg ggtctatca tccctgtct tactctctt ttatttca  
 4501 acctccgca gcctcttga ctgccaacct taggtgccca atggcctctg cttaacctga  
 4561 ggtcttttg agtcagctcc ggactacccc agtagatct tgtctctag aagaatcagt  
 4621 aggcagctc gaaggaagtc gatgtctgt ctgtcttt caaagtctg acacagaaag  
 4681 tgatgagcta tcagaagta tcaagacag ctgcttita caataaagt gtgatacaa  
 4741 agatgacagt atccgtgtct ttctggaatt aaaagaagag gatgaatag tgtgcacaca  
 4801 aactggcag gatgtgtgc ctggacaga acctctcagt ctacagacag aggatggctt  
 4861 ctggaacctt acaccagaac tgggactat attaatctt aatacaaatg gttgcacag  
 4921 ctctctaaa caaaaaggca tcaatctct aggtgtaaaa ggaagagaat gtctctgga  
 4981 cctaattgcc acaatgttg tactacagtt tattgcacc aggttggaag aagagggaat  
 5041 aggttcaaa tcaatgatga aaatgatga ccttctatt tccaggaata ttccctgggc  
 5101 tttagagca ataaagcaag caagtgaatg gtaagaaga actgaaggac agtaccatc  
 5161 tatctgccc cggttgaac tgggaacga ctgggactct gccaccaagc agttgctggg  
 5221 actccagccc ataagcactg tctccctct tcatagagtc ctccattaca gtcaaggcta  
 5281 agtcaaatga aactgaatt taaactttt gcagctctt atgtagaaa taatcaaatg  
 5341 ataatagata attataatga aacttatta aggttctat cagttagca attactgtc  
 5401 ttaaaaatta agtgaagaa gaattactt aatcaactaa caagcaataa taaatgaaa  
 5461 cttaaaataa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa