

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **240561**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **423116**

(22) Data zgłoszenia: **09.10.2017**

(51) Int.Cl.

C12N 9/18 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

C12Q 1/46 (2006.01)

(54) **Wektory DNA zdolne do transformacji i integracji z chromosomem *Leishmania tarentolae* zawierające gen kodujący butyrylocholinoesterazę BChE**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
23.04.2019 BUP 09/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
02.05.2022 WUP 18/22

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Gdański, Gdańsk, PL
Gdański Uniwersytet Medyczny,
Gdańsk, PL
GENOZYM SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

PIOTR SKOWRON, Gdańsk, PL
JACEK JASIECKI, Gdańsk, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Justyna Pawłowska

PL 240561 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są wektory DNA do uzyskiwania butyrylocholinoesterazy BChE zdolne do transformacji i integracji z chromosomem *Leishmania tarentolae*.

Enzymy z grupy ChE: acetylocholinesterazy (AChE) i butyrylocholinesteraza – BChE (E.C. 3.1.1.8) pełniące biologiczną rolę w przekazywaniu sygnału nerwowego (AChE) oraz naturalnej detoksyfikacji organizmu (BChE), charakteryzują się zdolnością rozkładania szerokiego spektrum związków posiadających wiązania estrowe oraz wiązania i unieczynnienia związków fosforoorganicznych – "OP". Stąd też znalazły szereg zastosowań cywilnych i militarnych, m.in. w: odtruwaniu po ekspozycji na pestycydy fosforoorganiczne, po ukąszeniach węży, owadów, przedawkowaniu narkotyków, w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych – m.in. demencji, alkoholizmu, narkomanii, chorobie Alzheimera, urazowych uszkodzeń układu nerwowego. Zastosowania militarne i podwójnego użycia obejmują działania w kierunku ochrony ekosystemów i ludzi ogniskujące się na wczesnym ostrzeganiu oraz usuwaniu związków toksycznych. Jednym z największych zagrożeń jest współczesne rozpowszechnienie oraz pozostałości powojenne, m.in. związków OP. Są to jedne z najsilniejszych znanych trucizn, działających na enzymy ChE poprzez fosforylację seryny w centrum aktywnym. OP są stosowane jako pestycydy, a także jako Bojowe Środki Trujące (skrót: „BST”) należące do grupy paralityczno-drgawkowej (m.in. soman, sarin, tabun, VX). W odróżnieniu od zagrożenia pestycydami, które da się oszacować obszarowo i czasowo, wzrastające zagrożenia użycia BST są nieprzewidywalne co do skali oraz momentu zaistnienia. Od strony ochrony zdrowia człowieka, najistotniejszym czynnikiem przy zatruciach jest czas od momentu kontaktu człowieka z tymi związkami do podania związków hamujących działanie OP. Szybka i czuła detekcja BST i pestycydów OP jest kluczowym parametrem pozwalającym zapobiec zatruciom. Sprawdzonym, kluczowym elementem biosensorów wykrywających BST i pestycydy z grupy OP, jest enzym końska BChE. Jest to hydrolaza serynowa obecna w tkankach zwierząt. Enzym ten może pomieścić w swoim centrum aktywnym większe substraty lub inhibitory niż AChE, enzymu odpowiedzialnego za hydrolizę acetylocholiny w ośrodkowym układzie nerwowym i połączeniach nerwowo-mięśniowych. AChE przez to że jest kluczowym enzymem transmisji impulsów nerwowych jest specyficznym celem dla pestycydów OP i BST. Zahamowanie aktywności enzymatycznej AChE prowadzi do cholinergicznym objawów zatrucia takich jak zwężenie źrenic, ślinotok, wymioty, bradykardia i paraliż ośrodka oddechowego. W związku ze specyficzną budową centrum aktywnego BChE i zdolność wiązania szerokiego spektrum związków chemicznych, znajduje ona zastosowanie jako czuła komponenta biosensorów oraz jest również skutecznym antidotum. W 2010 roku amerykańskie FDA (*Food and Drug Administration*) dopuściło użycie rekombinowanej ludzkiej BChE jako terapeutyka stosowanego w przypadku zatruc i prewencji zatruc BST, pestycydami OP, toksynami oraz do prób terapii chorób neurodegeneracyjnych.

W poniższych publikacjach ujawniono metody produkcji i modyfikacji ChE oraz ich pochodnych.

Eddleston i in. *Lancet* 371:597–607 (2008) ujawnia, że na świecie każdego roku notuje się ok. 200 tysięcy zgonów spowodowanych zatruciami pestycydami OP, są więc one poważnym problemem zdrowia publicznego, szczególnie na wiejskich terenach krajów rozwijających się.

Blong i in. *Biochem. J.* (1997) 327, 747–757 ujawnia, że domena tetrameryzacyjna ludzkiej BChE, zlokalizowana na C-terminalnym końcu polipeptydu, może być usunięta metodami inżynierii genetycznej, zachowując aktywność enzymatyczną białka o ile nie zostaje usuniętych więcej niż 50 reszt aminokwasowych.

Wierdl i in., *Biochem Pharmacol.* 59:773–781 (2000) ujawnia, że modyfikacje ludzkiej BChE potencjalnie wpływające na aktywność enzymatyczną polegające na zastosowaniu glikozydazy do usunięcia modyfikacji potranslacyjnych glikozylacji z już uformowanego *in vivo* białka wykazały, że BChE nie wymaga dalszej glikozylacji do aktywności enzymatycznej. Enzym uzyskany w wyniku transkrypcji-translacji *in vitro*, pozbawiony glikozylacji podczas biosyntezy, również wykazywał aktywność enzymatyczną, jakkolwiek wykazywał zmienione właściwości biochemiczne.

Main i in. *Biochem J.* 143:733–744 (1974) ujawnia procedurę izolowania do stanu jednorodności elektroforetycznej naturalnej (nierekombinantowej) BChE, uzyskując z 20 L osocza konia 15–18 mg białka. Procedura oparta była na frakcjonowaniu siarczanem amonowym, chromatografii jonowymiennej na DEAE-Sephadexie oraz preparatywnej elektroforezie w warunkach niedenaturujących. Dla zastosowania jako *antidotum* dla człowieka należałoby użyć osocza kilku koni, co czyni podejście tego rodzaju niepraktyczne z powodu braku dostępności materiału zwierzęcego w tak dużych ilościach, procedura jest nieekonomiczna oraz trudna do zaakceptowania ze względów epidemiologicznych i etycznych.

Kronman i in. *Gene* 121:295–304 (1992) ujawniają klonowanie w ssaczycy liniach komórkowych, ekspresję pod kontrolą wirusowych promotorów cytomegalowirusa, wirusa Rous sarcoma oraz SV40 oraz sekrecję na zewnątrz komórek rekombinantowej ludzkiej BChE. Uzyskane białko w postaci mieszaniny dimerów, tetramerów, oraz wariantów modyfikacji potranslacyjnych wykazywało aktywność enzymatyczną. Jednak, hodowla rekombinantowych komórek ssaczycy jest kosztowna, długotrwała i podatna na zakażenia mikrobiologiczne, co czyni ją niepraktyczną do zastosowań przemysłowych.

W opisie wynalazku EP 0388906 B oraz US 5,595,903 została ujawniona sekwencja ludzkiej AChE, określona na podstawie klonowania i sekwencjonowania cDNA. Kodowanie biologicznie aktywnego białka AChE zostało zweryfikowane poprzez sklonowanie cDNA do wektora pGEM, zawierającego promotor SP₆, wykonanie transkrypcji *in vitro* SP₆ RNA polimerazą, mikro iniekcję do oocytów *Xenopus* oraz przeprowadzenie testów enzymatycznych na obecność aktywności AChE. Zastosowana metodologia pozwoliła na wykazanie jedynie na skalę analityczną uzyskanie aktywnie biologicznego klonu cDNA ludzkiej AChE.

Wei i in. *Biochem. Pharmacol.* 60:121–126 (2000) ujawniają klonowanie genu kodującego ludzką BChE w komórkach larw owadów – jedwabnika morwowego *Bombyx mori*, infekowanych modyfikowanymi wirusami baculovirus oraz uzyskanie biologicznie aktywnego enzymu w skali analitycznej. Hodowla komórek owadów obarczona jest podobnymi ograniczeniami, jak hodowla komórek ssaczycy.

Mor i in. *Biotechnol. Bioeng.* 75:259–266 (2001) ujawniają konstrukcję rośliny transgenicznej, zawierającej klonowany i eksprymowany w ziemniakach gen kodujący aktywną biologicznie izoformę ludzkiej AChE, wykazującą się stabilnością i zachowującą parametry kinetyczne, odpowiadające ludzkiemu enzymowi. Metoda ma szereg zalet w porównaniu do rekombinantowych hodowli tkankowych czy metod izolowania z osocza, m.in. brak ograniczeń epidemiologicznych i wrażliwości na infekcje. Wadą jest natomiast powolne tempo wzrostu rekombinantowych roślin.

Lockridge i in. *J. Med. Chem. Biol. Radiol. Def.* 3:nihms5095 (2005) ujawnia metodę izolowania naturalnej ludzkiej BChE na skalę preparatywną ze 100 L osocza. Metoda zawiera etapy chromatografii jonowymienną na Q-Sepharose w niskim pH (4), chromatografii powinowactwa na procainamide-Sepharose, DEAE 8HR- HPLC, pozwalając na uzyskanie wysokooczyszczzonego enzymu, o niskim poziomie zawartości endotoksyn, spełniającego kryteria testów ochrony przed OP podczas badań na małpach. Poważną wadą metody są: bardzo ograniczona dostępność ilości osocza ludzkiego, koniecznych do prowadzenia procesu przemysłowego oraz względy epidemiologiczne.

Cerasoli i in. *Chem. Biol. Interact.* 157–158:363–365 (2005) ujawnili klonowanie i ekspresję BChE w transgenicznych kozach, wydzielających BChE w mleku. Preparat rekombinowanego białka BChE skomercjalizowano pod nazwą Protexia (Nexia Biotechnologies, Que., Canada). Problemem technicznym w procesie przemysłowym jest ograniczona ilość transgenicznych zwierząt i powolne tempo ich rozmnażania.

Saxena i in. *J. Mol. Neurosci.* 30:145–148 (2006) ujawnia, że BChE wiążąc związki toksyczne obecne w osoczu, hydrolizuje je albo trwale wiąże zapobiegając dotarciu ich do AChE obecnej w obwodowych połączeniach nerwowych i centralnym układzie nerwowym. 1 mol ludzkiej BChE wiąże 1 mol związków OP, a dawka 200 mg tego białka jest w stanie zapobiec efektom zatrucia człowieka o wadze 70 kg somanem w ilości 2x LD₅₀. Doświadczenia na modelach zwierzęcych, u których zaaplikowano wcześniej BChE wykazały pełną ochronę na dawkę 5x LD₅₀ podanego BST. Istotnym aspektem jest ilość białka konieczna do wywołania efektu antidotum – BChE potrzebnego dla jednego człowieka w celu inaktywacji toksyny – 200 mg czystego preparatu BChE jest to ilość bardzo duża, a jej izolacja metodami tradycyjnymi (z osocza konia) jest bardzo kosztowna.

W opisie wynalazku US 6,987,211 B1 zostało ujawnione klonowanie i ekspresja genu kodującego nie-synaptyczny wariant splicingowy ludzkiej AChE do transgenicznych myszy pod kontrolą promotora cytomegalowirusa. Konstrukcja genetyczna prowadziła do ekspresji i sekrecji ludzkiej wersji AChE w mleku mysim. W tym samym zgłoszeniu patentowym ujawnione zostały klonowane i eksprymowane przy użyciu w/w metody: ludzka AChE i BChE w wariantach naturalnego genu oraz na drodze ekspresji syntetycznych genów, posiadających delekcje i mutacje punktowe, a także klonowane i eksprymowane ChE pochodzące z owadów. Prezentowana metoda została zaprojektowana jako przeznaczona do analitycznych celów badawczych, nie odpowiadająca wymogom skalowania przemysłowego.

Evron i in. *FASEB J.* 21:2961–2969 (2007) ujawniają klonowanie ludzkiej AChE w *Nicotiana glauca*, rośliny spokrewnionej z tytoniem. Izolowany rekombinowany enzym miał cechy biochemiczne niewyróżnialne od enzymu otrzymanego z ssaczycy kultur komórkowych. Zastosowany w dawkach

równowolowych, eliminował całkowicie krótkotrwałe symptomy zatrucia OP u myszy. Ograniczeniem metody jest powolne tempo wzrostu roślin.

Li i in. *Chem. Biol. Interact.* 187:101–105 (2010) ujawniają uzyskanie wysokiego poziomu ekspresji klonowanego genu kodującego ludzką BChE w komórkach larwach owadów, infekowanych modyfikowanymi wirusami baculovirus. Metoda niesie w/w ograniczenia w stosowaniu kultur tkankowych w procesach przemysłowych.

Morel i Massoulie *Biochem. J.* 328:121–129 (1997) ujawniają klonowanie i ekspresję AChE oraz jej pochodnych delecyjnych szczura i węża w drożdżach *Pichia pastoris*, uzyskując rekombinantowe formy monomeryczne i dimeryczne, wykazujące aktywność biologiczną. Poziom produkcji rekombinantowych AChE wynosił nie więcej niż 1 mg białka z 1 L hodowli. Uzyskana konstrukcja genetyczna prowadzi do ekspresji AChE na bardzo niskim poziomie, gdyż typowo *Pichia pastoris* umożliwia produkcję na poziomie nawet powyżej 300 mg z 1 L hodowli, tym samym opisane konstrukty genetyczne nie nadają się do skalowania przemysłowego.

Celem wynalazku jest dostarczenie nowych wektorów DNA, zdolnych do transformacji i integracji z chromosomem *Leishmania tarentolae*.

Do tej pory próby wydajnej ekspresji genów kodujących ChE i biosynteza biologicznie aktywnych enzymów ChE w mikroorganizmach powszechnie używanych do przemysłowej, wydajnej produkcji białek, jak bakteria *Escherichia coli* czy drożdże nie powiodły się lub powiodły się jedynie częściowo. Wynika to z szeregu trudności: gwałtownej proteolizy ChE w bakteriach i innych mikroorganizmach, obecności wielu mostków dwusiarczkowych w ChE, niemożliwych do właściwego uformowania w mikroorganizmach prokariotycznych, a koniecznych do uzyskania aktywnej konformacji przez te enzymy, trudnościach w prawidłowym fałdowaniu białka do konformacji aktywnej enzymatycznie oraz braku wymaganych mechanizmów modyfikacji potranslacyjnych ChE. Strategie ekspresji w układach funkcjonalnie odpowiadających hodowlom mikroorganizmów –zawiesin komórek organizmów eukariotycznych: insektów, infekowanych baculovirusem oraz ssących liniach komórkowych są trudne do zastosowań przemysłowych ze względu na wysokie koszty, konieczność zaadoptowania etapów trudnych do zautomatyzowania, długiego okresu inkubacji, podatności na zakażenia bakteryjne.

Istotą wynalazku jest wektor DNA zdolny do transformacji i integracji z chromosomem *Leishmania tarentolae*, zawierający gen kodujący skróconą wersję butyrylocholinoesterazy BChE pokazany na Seq. 3 lub Seq. 7 lub Seq. 8, pozbawiony domeny tetrameryzacyjnej, kierujący biosyntezą rekombinantowego białka z zawartej w genie Otwartej Ramie Odczytu, przy czym gen zawierający Otwartą Ramę Odczytu koduje białko o Seq. 1 zawierające sumarycznie 564 reszt aminokwasowych i opatrzone na N-końcu sekwencją sekrecyjną *Leishmania* o 23 resztach aminokwasowych oraz zawierające dodatkowo 2 reszty aminokwasowe Gly-Ala, a na C-końcu 4 reszty aminokwasowe Leu-Lys-Gly-Thr oraz znacznik 6-ciu reszt His.

Wynalazkiem jest też wektor DNA zdolny do transformacji i integracji z chromosomem *Leishmania tarentolae*, do produkcji białka o Seq. 4, zawierającego sumarycznie 614 reszt aminokwasowych, w tym dodatkowe 2 reszty aminokwasowe Met-Ala na N-końcu, a na C-końcu opatrzone dodatkowymi 4 resztami aminokwasowymi Leu-Lys-Gly-Thr oraz znacznikiem 6-ciu reszt His, przy czym wektor zawiera gen kodujący holoenzym końskiej butyrylocholinoesterazy BChE o sekwencji Seq. 6.

Wynalazkiem jest też wektor DNA, zdolny do transformacji i integracji z chromosomem *Leishmania tarentolae* do produkcji białka o Seq. 4 zawierającego sumarycznie 614 reszt aminokwasowych, w tym dodatkowe 2 reszty aminokwasowe Met-Ala na N-końcu, a na C-końcu opatrzone dodatkowymi 4 resztami aminokwasowymi Leu-Lys-Gly-Thr oraz znacznikiem 6-ciu reszt His, przy czym wektor zawiera gen syntetyczny kodujący holoenzym końskiej butyrylocholinoesterazy BChE o Seq. 3.

Korzystnie jest to wektor wahadłowy klonowania i ekspresji białek, zawierającym dodatkowo minimum dwa origin replikacji, korzystnie dla *Escherichia coli* i/lub *Leishmania tarentolae*. Korzystnie, wektor DNA koduje sygnał sekrecyjny, korzystnie pochodzący z *Leishmania*, geny oporności na antybiotyki, korzystnie bleomycynę i/lub ampicylinę, promotor transkrypcji, korzystnie bakteriofaga T7, gen represora transkrypcji, korzystnie regulowany przez tetracyklinę, gen operatora, korzystnie regulowany przez represor tetracyklinowy, sygnał inicjacji translacji, sekwencję kodującą sygnał stopu translacji, korzystnie sekwencję kodującą 6-ciu reszt histydyny.

Wektory DNA zawierają sekwencję wskazane i przedmiot wynalazku zobrażowano na rysunku.

Opisano dodatkowo sposób klonowania molekularnego, ekspresji i produkcji rekombinantowych BChE i ChE – jako porównanie wynalazku, w oparciu o syntetyczne lub naturalne geny, polegający na:

- otrzymaniu syntetycznego genu kodującego,

- powieleniu metodą PCR syntetycznego lub naturalnego genu BChE,
- wklonowaniu do wektora ekspresyjnego *Leishmania tarentolae*, pLEXY I-blecherry3, który koduje gen fuzyjny,
- izolowaniu powielonego produktu PCR i poddaniu trawieniu endonukleazami restrykcyjnymi, korzystnie Sall i MspCI,
- poddaniu wektora również trawieniu endonukleazami restrykcyjnymi, Sall i MspCI,
- poddaniu uzyskanych produktów trawienia rozdzielowi elektroforetycznemu w żelu agarozowym
- oczyszczeniu fragmentów DNA,
- poddaniu ligacji z zastosowaniem ligazy DNA, bakteriofaga T4, oczyszczony liniowy wektor, pLEXY 1-blecherry3 oraz trawiony produkt PCR – usunięciu naturalnej N-terminalnej aminokwasowej sekwencji sygnałowej do sekrecji zewnątrzkomórkowej i wstawienie w jej miejsce sekrecyjnej sekwencji sygnałowej *Leishmania tarentolae*,
- usunięciu C-terminalnej domeny tetrameryzacyjnej,
- skonstruowaniu fuzyjnej Otwartej Ramy Odczytu,
- eksprymowaniu biologicznie aktywnego białka skróconej wersji BChE oraz białka holoenzymu BChE w *Leishmania tarentolae*
- izolowaniu rekombinowanych białek.

Zastosowano następujące startery:

- a) dla syntetycznego genu
5'-ATAGTCGACGCTGGCGCCGAAGAAGACATCATCATCACCACC-3' oraz
5'-ATTCTTAAGAACTTTCGGGAAGAACAGGGTCCAGAAACGG-3'.
- b) dla genu na bazie cDNA
5'-TAGCCATGGCCATGCAGAGCTGGGGTACAATC-3' i
5'-ACTCTTAAGAAAATCTGAACAGCTTTCTTTCTTGCTAGTG-3'.

Opis sekwencji:

Natywny gen kodujący butyrylocholinesterazę BChE pokazany jest Seq. 6 i jest znany i opisany poniżej jako przykład do porównania z wynalazkiem. Przedmiotem wynalazku są opisane konstrukty – wektory DNA – które zawierają pewne znane części – sekwencji lub części ale każda wymieniona sekwencja i modyfikacja w jednym konstrukcie jest nowa i stanowi przedmiot wynalazku. W szczególności wektor DNA do transformacji i integracji z chromosomem *Leishmania tarentolae*, według wynalazku zawiera gen pokazany Seq. 3 lub Seq. 6 lub Seq. 7 lub Seq. 8 kodujące wersje końskiego BChE z modyfikacjami opisaną zgodnie z innymi sekwencjami opisanymi niżej.

- Seq. 1 – sekwencja aminokwasowa, tworząca białko SP-BChE-His. SP – oznacza sekwencję sekrecyjną *Leishmania*, BChE – fragment syntetycznego genu, His – oznacza znacznik 6-ciu reszt His.
- Seq. 2 – sekwencja aminokwasowa, kodująca białko GA-BChE-His. GA – oznacza 2 reszty Gly-Ala, wynikające z konstrukcji wektora pLEXY-blecherry3 oraz początek sekwencji fragmentu syntetycznego genu po odcięciu SP, His – oznacza znacznik 6-ciu reszt His.
- Seq. 3 – sekwencja nukleotydowa Otwartej Ramy Odczytu fragmentu BChE, pozbawiona odcinka DNA kodującego N-terminalną końską sekwencję sekrecyjną oraz C-terminalną 45-cio aminokwasową domenę tetrameryzacyjną o długości 1587 par zasad, w formie jednoniciowej.
- Seq. 4 – sekwencja aminokwasowa, tworząca białko SP-BChE-HorseHis oraz SP-BChE-synthHis. SP – oznacza końską sekwencję sekrecyjną, BChE-Horse – pełnej długości naturalny gen, BChE-synt – pełnej długości syntetyczny gen, His – oznacza znacznik 6-ciu reszt His.
- Seq. 5 – sekwencja aminokwasowa, tworząca dojrzałe białko BChE-HorseHis oraz BChE-synthHis, wskazane w Seq. 4 po odcięciu końskiej sekwencji sygnałowej.
- Seq. 6 – sekwencja nukleotydowa produktu PCR, w formie jednoniciowej, kodującego białko SP-BChE-HorseHis (bez elementów sekwencji pochodzących z wektora pLEXY I-blecherry3).
- Seq. 7 – sekwencja nukleotydowa produktu PCR, w formie jednoniciowej, kodującego białko SP-BChE-synthHis (bez elementów sekwencji pochodzących z wektora pLEXY I-blecherry3).

- Seq. 8– powstający produkt PCR o długości 1614 par zasad przedstawiony w formie jednoniciowej.
- Seq. 9 – sekwencja nukleotydowa plazmidu pLEX-BCHE-ST w formie jednoniciowej o długości 8807 par zasad. pLEX-BCHE-ST oznacza wektor pLEXY I-blecherry3 zawierający wklonowany skrócony syntetyczny gen BChE, opatrzony sekwencją sekrecyjną *Leishmania*.
- Seq. 10 – sekwencja nukleotydowa plazmidu pLEXY-BChEHor o długości 8957 par zasad, w formie jednoniciowej. pLEX-BChEHor oznacza wektor pLEXY I-blecherry3 zawierający wklonowany pełnej długości naturalny koński gen BChE, opatrzony końską sekwencją sekrecyjną.
- Seq. 11 – sekwencja nukleotydowa plazmidu pLEXY-BChEEco o długości 8957 par zasad, w formie jednoniciowej. pLEX-BChEHor oznacza wektor pLEXY I-blecherry3 zawierający wklonowany pełnej długości syntetyczny gen BChE, opatrzony końską sekwencją sekrecyjną.

Opisany w stanie techniki problem z uzyskaniem biologicznie aktywnych cholinoesteraz został rozwiązany poprzez niniejszy wynalazek.

Wynalazek ilustrują następujące przykłady wykonania, nie stanowiące jego ograniczenia.

P r z y k ł a d 1. Schemat realizacji sposobu według wynalazku.

Schemat sposobu według wynalazku omówiony na przykładzie klonowania molekularnego, ekspresji i produkcji skróconej wersji rekombinantowej BChE końskiej oraz holoenzymu pełnej długości BChE końskiej w mikroorganizmie *Leishmania tarantolae*, w oparciu o syntetyczny gen, którego sekwencja została zaprojektowana w oparciu o naturalne sekwencje cDNA, dostępne w publicznych bazach danych. Zaprezentowano również przykład klonowania naturalnego genu, uzyskanego z cDNA konia. Przedstawiony schemat sposobu wynalazku jest uniwersalny w zastosowaniu do klonowania molekularnego, ekspresji i produkcji rekombinantowego białka BChE lub ChE o pełnej długości oraz wariantów delecyjnych i/lub mutagenizowanych BChE lub ChE, pochodzących z organizmów innych niż koń w mikroorganizmie *Leishmania tarantolae*.

Protozoan *Leishmania tarentolae*, pierwotnie izolowany z jelita gekona *Tarentola mauritanica* jest niechorobotwórczy dla człowieka (Biosafety level 1), pozwalając na bezpieczną hodowlę w warunkach laboratoryjnych. Na bazie modyfikowanego genetycznie protozoana *Leishmania tarentolae* został opracowany komercyjny zestaw do klonowania i ekspresji białek – LEXSY, firmy Jena Bioscience GmbH (Niemcy) i został on zastosowany w przedmiotowym wynalazku. Istotna z punktu widzenia zastosowania do klonowania i ekspresji eukariotycznych białek jest właściwość posiadania zbliżonych do istniejących w komórkach ssaczych, skomplikowanych mechanizmów zwijania i modyfikacji potranslacyjnej białek. Poziom glikozylacji i sposób rozgałęzienia łańcuchów wielocukrowych różni się od bakteryjnego (zasadniczo brak), drożdżowego (częsta hyperglikozylacja) czy systemu baculowirusowego (często niepełna glikozylacja), natomiast zbliżony jest do typu ssaczego. Obecność glikozylacji i jej odpowiedni sposób są niezbędne do prawidłowego fałdowania białek i ich aktywności enzymatycznych. Jakkolwiek *Leishmania tarentolae* charakteryzuje się znacznie dłuższym okresem cyklu doświadczonego niż eksperymenty klonowania i ekspresji białek w bakteriach i drożdżach, z powodu znacznie dłuższego od bakterii czasu trwania jednej generacji – ok. 4 godzin, niedogodność ta jest rekompensowana wysokim poziomem ekspresji białka, wg danych literaturowych przekraczającym 300 g/L hodowli, łatwością jego sekrecji do pożywki, a tym samym znakomicie udogodnioną procedurą izolowania rekombinantowego białka oraz jego właściwym sfałdowaniem do formy aktywnej biologicznie i wysoką rozpuszczalnością. W wynalazku użyto indukowalny wariant systemu LEXSInduce3, szczep *Leishmania tarentolae* (LEXSY host T7-TR), który cechuje indukowalny system nadprodukcji klonowanego białka oparty na hybrydowym promotorze bakteriofaga T7 i sprzężonym z nim operatorze, pochodzącym z regionu regulatorowego genu kodującego represor, kontrolujący oporność na tetracyklinę. Poziom biosyntezy rekombinantowego białka sklonowanego w w/w układzie jest ściśle kontrolowany poprzez dobranie odpowiedniego stężenia tetracykliny. Tak precyzyjna możliwość dobrania poziomu nadprodukcji białek jest szczególnie istotna w przypadku ekspresji białek toksycznych dla rekombinantowego gospodarza. *Leishmania tarentolae* T7-TR posiada modyfikację chromosomu, polegającą na zintegrowaniu genów kodujących T7 RNA polimerazę, specyficzną wobec promotora T7 oraz gen kodujący tetracyklinowy represor transkrypcji w regionie genu *ssu*, kodującego mniejszą podjednostkę rybosomalnego RNA. W tej lokalizacji chromosomalnej zachodzi konstytutywna ekspresja obu genów, za pośrednictwem RNA polime-

razy i *Leishmania tarentolae*. Stabilność modyfikacji genetycznej jest utrzymywana poprzez wbudowanie kasety oporności na antybiotyki higromycynę i nourseotricinę w zbliżonej lokalizacji chromosomalnej *Leishmania tarentolae* T7-TR. Poza wyspecjalizowanym gospodarzem, do klonowania i ekspresji zastosowano wektor wahadłowy pLEXSY-blecherry3, będący częścią w/w zestawu, zdolny do namnażania w bakterii *Escherichia coli*, oferujący tym samym możliwość wygodnego przygotowywania konstruktów genetycznych oraz zdolny do integracji chromosomalnej do *Leishmania tarentolae* T7-TR. Do wektora tego klonowany został fragment DNA, kodujący BChE w taki sposób, że znajdował się on w odpowiedniej orientacji i ramie odczytu w stosunku do promotora T7 i sygnałów startu translacji. Za sklonowanym genem kodującym BChE znajdował się odpowiedniej orientacji i opatrzony sygnałami startu translacji gen, pochodzący z użytego wektora i kodujący białko reporterowe blecherry, którego ekspresję można precyzyjnie monitorować spektrofotometrycznie. Poziom biosyntezy białka blecherry w tym układzie jest skorelowany z poziomem biosyntezy klonowanego i ekspresjonowanego genu białka BChE w *Leishmania tarentolae* T7-TR. Wykonanie ekspresyjnego konstruktów genetycznych wykonano w *Escherichia coli*. W kolejnym etapie wektor zlinearyzowano podwójnym cięciem enzymem restrykcyjnym SmaI, a następnie wprowadzono do komórek *Leishmania tarentolae* T7-TR, gdzie podlegał on integracji chromosomalnej w rejonie bliskim genu *ssu*. Integracja chromosomalna jest stabilna, dodatkowo podlega selekcji poprzez gen kodujący oporność na antybiotyk bleomycynę, zlokalizowany w zintegrowanym wektorze.

P r z y k ł a d 2. Projekt syntetycznego genu, kodującego skróconą wersję końskiej BChE, pozbawioną domeny tetrameryzacyjnej.

W oparciu o sekwencje cDNA, dostępne w publicznych bazach danych (*Equus caballus* BChE, cDNA, NCBI Reference Sequence: NM_001081850.1), zaprojektowano całkowicie syntetyczny gen, kodujący pełnej długości holoenzym BChE. Sekwencja nukleotydowa na poziomie DNA różniła się istotnie od naturalnej sekwencji nukleotydowej genu końskiej BChE, gdyż nie zawierała intronów, zawierała optymalizację trzeciorzędowych struktur mRNA, odmienna też była kompozycja kodonów, jednak kodowany był polipeptyd o identycznej sekwencji aminokwasowej jak naturalny enzym – końska BChE, której metoda ekspresji w aktywnej enzymatycznie formie jest głównym aspektem wynalazku. Przedstawiony powyżej uniwersalny schemat został zastosowany do klonowania molekularnego i ekspresji genetycznej wariantów genu kodującego BChE: wersji rekombinantowego białka BChE końskiej o pełnej długości oraz wariantu skróconego, w których usunięto części sekwencji, nie istotne dla aktywności enzymatycznej. Korzystnie, jest to wersja, w której celem poprawienia poziomu biosyntezy, sekrecji i rozpuszczalności białka rekombinantowego. W tym celu usunięto N-terminalną aminokwasową sekwencję sygnałową do sekrecji zewnątrzkomórkowej, która jest mniej wydajna w kierowaniu sekrecji zewnątrzkomórkowej w *Leishmania tarentolae* oraz C-terminalną domenę tetrameryzacyjną, istotną dla funkcji *in vivo* u konia, natomiast nieistotną dla aktywności enzymatycznej białka na potrzeby zastosowań w biotechnologii. W przykładzie realizacji zaprezentowanej na Fig. 1 przedstawiono mapę pełnej długości syntetycznego genu o długości 1806 par zasad, kodującego rekombinantową końską BChE o sekwencji aminokwasowej zawierającej 602 reszty aminokwasowe, tworzące białko o masie cząsteczkowej 68,83 kDa odpowiadające sekwencji, kodowanej przez końskie cDNA, z zaznaczonymi elementami funkcjonalnymi: końska sekwencja sygnałowa (signal peptide, niebieska strzałka), punkty glikozylacji (*Glic* 1–8, pomarańczowe trójkąty), rejon mostków dwusiarczkowych (*Disulfide* 1–3, pomarańczowe nawiasy), reszty aminokwasowe centrum aktywnego (*Active site* 1–3, pomarańczowe pionowe prostokąty), domenę tetrameryzacyjną (*Tetramerization domain*, pomarańczowy poziomy prostokąt). W przykładzie realizacji zaprezentowanej na Fig. 2, przedstawiono sekwencję aminokwasową rekombinantowego bioaktywnego fragmentu genu BChE, gdzie końską sekwencję sygnału sekrecji zastąpiono sekwencją aminokwasową sygnału sekrecyjnego (SP) *Leishmania* (23 reszty aminokwasowe, kodowane przez 69 par zasad, niebieska czcionka), dodatkowe 2 reszty aminokwasowe Gly-Ala, kodowane przez 6 par zasad, których dodanie wynika z konstrukcji wektora pLEXSY-blecherry 3 (pomarańczowa czcionka), sekwencja aminokwasowa kodowana przez Otwartą Ramę Odczytu fragmentu BChE, pozbawionego C-terminalnej 45-cio aminokwasowej domeny tetrameryzacyjnej (529 reszt aminokwasowych, kodowanych przez 1587 par zasad, czarna czcionka), dodatkowe 4 reszty aminokwasowe Leu-Lys-Gly-Thr, kodowane przez 12 par zasad, których dodanie wynika z konstrukcji wektora pLEXSY-blecherry 3 (czerwona czcionka), znacznik 6-ciu reszt His do izolowania rekombinantowego białka metodą chromatografii metalopowinowactwa, kodowany przez 18 par zasad (czerwona czcionka). Sumarycznie, skonstruowana fuzyjna Otwarta Rama Odczytu koduje 564 reszt aminokwasowych, tworzących białko fuzyjne SP-BChE-His o masie cząsteczkowej 63,66 kDa. W trakcie procesu dojrzewania i sekrecji białka do

pożywki odcięta zostaje sygnałowa sekwencja aminokwasowa do sekrecji zewnątrzkomórkowej, w wyniku czego powstaje skrócone białko fuzyjne GA-BChE-His o długości 541 reszt aminokwasowych i masie cząsteczkowej 61,39 kDa. Sekwencję aminokwasową, tworzącą białko SP-BChE-His przedstawia SEKWENCJA 1; sekwencję aminokwasową, kodującą białko GA-BChE-His przedstawia SEKWENCJA 2. Sekwencję nukleotydową Otwartej Ramy Odczytu fragmentu BChE, pozbawionej odcinak DNA kodującego N-terminalną końską sekwencję sekrecyjną oraz C-terminalną 45-cio aminokwasową domenę tetrameryzacyjną o długości 1587 par zasad, w formie jednoniciowej, przedstawia SEKWENCJA 3.

P r z y k ł a d 3. Projekt naturalnego i syntetycznego genu, kodującego holoenzym BChE, zawierający domenę tetrameryzacyjną.

W przykładzie realizacji zaprezentowanej na Fig. 3, przedstawiono sekwencję aminokwasową rekombinantowego bioaktywnego holoenzymu białka BChE, gdzie zachowano końską sekwencję sygnału sekrecji (28 reszty aminokwasowe, kodowane przez 84 pary zasad, niebieska czcionka), poprzedzoną dodatkowymi 2 resztami aminokwasowymi Met-Ala, kodowanymi przez 6 par zasad, których dodanie wynika z konstrukcji wektora pLEXY-blecherry 3 (pomarańczowa czcionka), sekwencja nukleotydowa tworząca Otwartą Ramę Odczytu, kodującą dojrzały holoenzym BChE (574 reszt aminokwasowych, kodowanych przez 1722 par zasad, czarna czcionka), dodatkowe 4 reszty aminokwasowe Leu-Lys-Gly-Thr, kodowane przez 12 par zasad, których dodanie wynika z konstrukcji wektora pLEXY-blecherry 3 (czerwona czcionka), znacznik 6-ciu reszt His do izolowania rekombinantowego białka metodą chromatografii metalopowinowactwa, kodowany przez 18 par zasad (czerwona czcionka). Sumarycznie, skonstruowane fuzyjne Otwarte Ramy Odczytu składają się z 1842 par zasad, kodujących 614 reszt aminokwasowych, tworzących białka fuzyjne SP-BChE-HorseHis (uzyskane na bazie cDNA) oraz SP-BChE-synt-His (na bazie syntetycznego genu) o masach cząsteczkowych 70,66 kDa. W trakcie procesu dojrzewania i sekrecji białek do żywki odcięta zostaje sygnałowa sekwencja aminokwasowa, w wyniku czego powstają skrócone białka fuzyjne BChE-HorseHis oraz BChE-synt-His o długościach 584 reszt aminokwasowych i masach cząsteczkowych 67,15 kDa. Sekwencję aminokwasową, tworzącą białka SP-BChE-HorseHis oraz SP-BChE-syntHis, przedstawia SEKWENCJA 4; sekwencję aminokwasową, tworzącą dojrzałe białka BChE-HorseHis oraz BChE-syntHis, przedstawia SEKWENCJA 5; sekwencję nukleotydową produktu PCR, w formie jednoniciowej, kodującego białko SP-BChE-HorseHis (bez elementów sekwencji pochodzących z wektora pLEXY I-blecherry3), przedstawia SEKWENCJA 6; sekwencję nukleotydową produktu PCR, w formie jednoniciowej, kodującego białko SP-BChE-syntHis (bez elementów sekwencji pochodzących z wektora pLEXY I-blecherry3), przedstawia SEKWENCJA 7.

P r z y k ł a d 4. Konstrukcja i klonowanie molekularne skróconej wersji rekombinantowego białka BChE końskiej.

W oparciu o sekwencję nukleotydową syntetycznego genu, kodującego dojrzałą (pozbawioną intronów) wersję genu, kodującego końską BChE, wskazanej w przykładowej realizacji w Przykładach 1 i 2, wykonano reakcję powielania DNA za pomocą techniki PCR. Skrócony fragment genu, kodującego BChE, zaprezentowanej na Fig. 1 i Fig. 2, powielono przy zastosowaniu starterów:

5'-ATAGTCGACGCTGGCGCCGAAGAAGACATCATCACCACC-3' oraz

5'-ATTCTTAAGAACTTTCGGGAAGAACAGGGTCCAGAAACGG-3'.

Na 5' końcach starterów wstawiono sekwencje nukleotydowe (podkreślone), przecinane przez endonukleazy restrykcyjne Sall i MspCl. Powstający produkt PCR o długości 1614 par zasad (przedstawiony w formie jednoniciowej jako SEKWENCJA 8) zawiera skrócony gen BChE, który po wklonowaniu do wektora pLEXY I-blecherry3, koduje gen fuzyjny, opatrzony na końcu 5' sekwencją nukleotydową, kodującą sygnał sekrecyjny *Leishmania* – Met-Ala-Ser-Arg-Leu-Val-Arg-Val-Leu-Ala-Ala-Ala-Met-Leu-Val-Ala-Ala-Ala-Val-Ser-Val-Asp-Ala oraz dwie dodatkowe reszty aminokwasowe Gly-Ala, a na końcu 3' opatrzony jest sekwencjami, kodującymi 4 dodatkowe reszty aminokwasowe Leu-Lys-Gly-Thr oraz znacznik 6-ciu reszt His w miejsce sekwencji nukleotydowej, kodującej domenę tetrameryzacyjną BChE. Sumarycznie zaprojektowana Otwarta Rama Odczytu koduje 564 reszty aminokwasowe. Uzyskany produkt powielania PCR izolowano przy użyciu zestawu mini kolumniek krzemionkowych do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych (Roche, Szwajcaria) i poddano trawieniu endonukleazami restrykcyjnymi Sall i MspCl. Wektor pLEXY I-blecherry3 również poddano trawieniu Sall i MspCl. Uzyskane produkty trawienia poddano rozdzielowi elektroforetycznemu w 1% żelu agarozowym, z którego wycięto liniowy fragment wektora pLEXY I-blecherry3, zawierający kasetę ekspresyjną oraz strawiony produkt PCR. Fragmenty DNA oczyszczano przy użyciu zestawu do izolowania DNA z żelu agarozowego (Roche, Szwajcaria). Po oczyszczeniu, liniowy wektor pLEXY I-blecherry3 i tra-

wiony produkt PCR poddano ligacji z zastosowaniem ligazy DNA bakteriofaga T4 (New England Biolabs, USA), zachowując ciągłość Otwartej Ramy Odczytu ze znacznikiem 6-ciu reszt histydy, wbudowanym na C-końcu polipeptydu. Powstały plazmid pLEX-BCHE-ST o długości 8807 par zasad, ilustruje Fig. 4, oznaczając: promotor bakteriofaga T7, kontrolujący biosyntezę BChE (czerwona, łamana strzałka / T7 promoter), sekwencje nukleotydowe rozpoznawane przez wyselekcjonowane endonukleazy restrykcyjne (Sall, Afill, Swal), skrócony gen kodujący fragment BChE (BChE z SP (lexsy) –tetra), znacznik 6-ciu reszt His (His tag), gen reporterowi blecherry (blecherry), sekwencje nukleotydowe regionu genu *ssu*, kodującego mniejszą podjednostkę rybosomalnego RNA (5' odc i 3' odc), gen oporności na ampicylinę (Amp R). Otrzymany w wyniku ligacji wektor poddano analizie restrykcyjnej, a klonowany fragment genu BChE sekwencjonowano w celu potwierdzenia uzyskania zaprojektowanego konstruktów wektora. Sekwencję nukleotydową plazmidu pLEX-BCHE-ST w formie jednoniciowej o długości 8807 par zasad przedstawia SEKWENCJA 9.

Przykład 5. Konstrukcja i klonowanie molekularne holoenzymu naturalnego i syntetycznego genu, kodującego holoenzym BChE końską, zawierający domenę tetrameryzacyjną.

W oparciu o sekwencję nukleotydową syntetycznego genu oraz sekwencję nukleotydową naturalnego cDNA, kodujących dojrzałe (pozbawione intronów) wersje genu, kodującego końską BChE, wskazaną w przykładowej realizacji w Przykładzie 1, 2 i 3, wykonano reakcję powielania DNA za pomocą techniki PCR pełnej długości genów – naturalnego oraz syntetycznego, kodujących BChE, zaprezentowanych na Fig. 1, 3 i 5. Gen syntetyczny powielono przy zastosowaniu starterów:

5'-TAGCCATGGCCATGCAGTCCTGGGGTACCATC -3' i

5'-TATTCTTAAGGAAGTCGGAGCAGGATTC-3'.

Gen uzyskany na bazie cDNA powielono przy zastosowaniu starterów:

5'-TAGCCATGGCCATGCAGAGCTGGGGTACAATC-3' i

5'-ACTCTTAAGAAAATCTGAACAGCTTTCTTTCTTGCTAGTG-3'.

Na 5' końcach starterów wstawiono sekwencje nukleotydowe (podkreślone), przecinane przez endonukleazy restrykcyjne NcoI i MspCI. Powstające produkty PCR o długości 1826 par zasad (na matrycy cDNA) i 1827 par zasad (na matrycy syntetycznego genu BChE) zawiera kompletną Otwartą Ramę Odczytu pełnej długości genu BChE, który po wklonowaniu do wektora pLEXSY I-blecherry3, koduje gen fuzyjny, opatrzony na końcu 5' sekwencją nukleotydową, kodującą sygnał sekrecyjny *Leishmania* – Met-Ala-Ser-Arg-Leu-Val-Arg-Val-Leu-Ala-Ala-Ala-Met-Leu-Val-Ala-Ala-Ala-Val-Ser-Val-Asp-Ala oraz dwie dodatkowe reszty aminokwasowe Gly-Ala, a na końcu 3' opatrzony sekwencjami, kodującymi 4 dodatkowe reszty aminokwasowe Leu-Lys-Gly-Thr oraz znacznik 6-ciu reszt His. Uzyskane produkty powielania PCR izolowano przy użyciu zestawu mini kolumniek krzemionkowych do oczyszczania DNA po reakcjach enzymatycznych (Roche, Szwajcaria) i poddano trawieniu endonukleazami restrykcyjnymi Sall i MspCI. Wektor pLEXSY I-blecherry3 również poddano trawieniu Sall i MspCI. Uzyskane produkty trawienia poddano rozdzielowi elektroforetycznemu w 1% żelu agarozowym, z którego wycięto liniowy fragment wektora pLEXSY I-blecherry3, zawierający kasetę ekspresyjną oraz strawiony produkt PCR. Fragmenty DNA oczyszczano przy użyciu zestawu do izolowania DNA z żelu agarozowego (Roche, Szwajcaria). Po oczyszczeniu, liniowy wektor pLEXSY I-blecherry3 i trawiony produkt PCR poddano ligacji z zastosowaniem ligazy DNA bakteriofaga T4 (New England Biolabs USA). Powstały konstrukt, zachowuje ciągłość Otwartej Ramy Odczytu BChE ze znacznikiem 6-ciu reszt His, wbudowanym na C-końcu polipeptydu. Powstałe plazmidy pLEX-BChEHor (otrzymany na bazie cDNA) oraz pLEX-BChEEco (na bazie genu syntetycznego), zawierające dwa warianty pełnej długości genów, kodujących holoenzymy BChE ilustruje Fig. 5, gdzie oznaczono: promotor faga T7, kontrolujący holoenzymy BChE (SP-BCHE horseHis lub SP-BCHE-synthHis), znacznik 6-ciu reszt His (His tag), gen reporterowi blecherry (blecherry), sekwencje nukleotydowe regionu genu *ssu*, kodującego mniejszą podjednostkę rybosomalnego RNA (5' odc i 3' odc), gen oporności na ampicylinę (Amp R). Otrzymany w wyniku ligacji wektor poddano analizie restrykcyjnej, a klonowane geny BChE sekwencjonowano w celu potwierdzenia uzyskania zaprojektowanych konstruktów wektorów. Sekwencję nukleotydową plazmidu pLEXSY-BChEHor o długości 8957 par zasad, w formie jednoniciowej, przedstawia SEKWENCJA 10; sekwencję nukleotydową plazmidu pLEXSY-BChEEco o długości 8957 par zasad, w formie jednoniciowej, przedstawia SEKWENCJA 11.

Przykład 6. Transformacja *Leishmania tarentolae* T7-TR skonstruowanymi wektorami, niosącymi konstrukty ekspresyjne, kodujące holoenzymy i skrócony wariant genów BChE.

W przykładowej realizacji zaprezentowanej na Fig. 4 i Fig. 5 skonstruowane wektory, niosące skrócony wariant BChE oraz holoenzymy BChE, wskazane w przykładowej realizacji w Przykładach 1,

2, 3, 4, 5 poddano transformacji za pomocą metody elektroporacji. W tym celu wskazane wektory DNA przecięto endonukleazą restrykcyjną Sma w celu uzyskania form liniowych. Produkty trawienia poddano elektroforezie w 1% żelu agarozowym, a następnie wyizolowano z żelu fragmenty zawierające moduły ekspresyjne genów BChE oraz sekwencje nukleotydowe rejonu genu *ssu*. Fragmenty te zostały wprowadzone do komórek *Leishmania tarentolae* T7-TR pod wpływem impulsu prądu elektrycznego o napięciu 450 V trwającego 5,4 ms przy zastosowanej pojemności kondensatora 450 nF. Transformowane komórki *Leishmania tarentolae* T7-TR inkubowano przez 20 godzin w temperaturze 26°C w pożywce BHI, a następnie wysiewano na szalki Petriego, zawierające zestalone agarem podłoże BHI, uzupełnione antybiotykiem selekcyjnym – bleomycyną. Inkubację prowadzono przez 8 dni w temperaturze 26°C. W przykładowej realizacji zaprezentowanej na Fig. 6 po 8-miu dniach na płytce obserwowano kolonie *Leishmania tarentolae* T7-TR transformowane wektorami wskazanymi w Przykładach 1, 2, 3, 4. W celu zweryfikowania ekspresji klonowanych wariantów BChE monitorowano poziom sprzężonej ekspresji genu reporterowego blecherry. Wykonano odcisk kolonii z szalki Petriego, zawierającej kolonie transformowanego *Leishmania tarentolae* T7-TR na membranie nitrocelulozowej i membranę umieszczono na szalce Petriego, zawierającej zestalone agarem podłoże BHI, uzupełnione bleomycyną i inducerem transkrypcji hybrydowego promotora T7 – tetracykliną w stężeniu 100 µg/ml. W przykładowej realizacji zaprezentowanej na Fig. 7 po 4 dniach na płytce obserwowano kolonie *Leishmania tarentolae* T7-TR transformowane wektorami wskazanymi w Przykładach 4 i 5, które zabarwiły się na kolor różowy, wskazujący na ekspresję sprzężonego z genami BChE genu reporterowego blecherry. Ze względu na możliwość integracji do chromosomu *Leishmania tarentolae* T7-TR różnych ilości kopii modułu ekspresyjnego wektorów wskazanych w Przykładach 4 i 5, a tym samym spodziewanego różnego poziomu ekspresji blecherry oraz BChE do dalszej analizy wybrano kolonie wykazujące najciemniejszy różowy odcień, skorelowany z poziomem indukcji transkrypcji z hybrydowego promotora T7 i biosyntezy blecherry.

Przykład 7. Nadprodukcja rekombinantowych BChE w komórkach *Leishmania tarentolae*.

W przykładowej realizacji zaprezentowanej w Przykładzie 6 w wyniku transformacji uzyskano kilkadziesiąt klonów różniących się poziomem ekspresji genu reporterowego blecherry, jako efekt integracji różnej ilości kopii kasety ekspresyjnej, zawierającej gen, kodujący skróconą wersję BChE do genomu klonów *Leishmania tarentolae* T7-TR. Wybrany klon o silnej, ocenionej wizualnie ekspresji blecherry użyto do zaszczepienia 10 ml hodowli płynnej w pożywce BHI, uzupełnionej bleomycyną i hodowano wytrząsając (140 obr/min) przez 72 godziny w temperaturze 26°C. Uzyskaną hodowlę użyto do zaszczepienia 2 kultur: 100 ml ekspresyjnej w pożywce BHI, uzupełnionej bleomycyną i tetracykliną (100 µg/ml) oraz 10 ml kultury kontrolnej w pożywce BHI, uzupełnionej bleomycyną, po czym hodowano wytrząsając (140 obr/min) przez 72 godziny w temperaturze 26°C. W odstępach 24 godzinnych pobierano próbki 100 µl każdej hodowli, nanoszono na płytkę 96-dołkową, przeprowadzając w czytniku płytek TECAN Infinity M200Pro pomiar gęstości optycznej OD przy długości fali 600 nm oraz fluorescencji białka blecherry przy długości fali wzbudzenia 590 nm i długości fali emisji 620 nm. W przykładowej realizacji zaprezentowanej na Fig. 8, 9 i 10 wzrost poziomu ekspresji blecherry był skorelowany ze wzrostem OD hodowli. Powyżej czasu hodowli 48 godzin poziom OD₆₀₀ i ekspresji blecherry nie wzrastał znacząco, stąd hodowle zatrzymywano po 72 godzinach i komórki rekombinantowych *Leishmania tarentolae* T7-TR wirowano przy 4000 g przez 20 min. Ekspymowane BChE jako białka wydzielane na zewnątrz komórki, pozostawały w pożywce. Odwirowane komórki zawierały białko reporterowe blecherry ze względu na jego cytoplazmatyczną lokalizację, tym samym ekspymowane białka blecherry i BChE zostały rozdzielone. Fig. 8 ukazuje zależność OD₆₀₀ od czasu hodowli po indukcji, Fig. 9 ukazuje zależność fluorescencji blecherry od czasu hodowli po indukcji, Fig. 10 ukazuje odwirowane komórki po 72 godzinach hodowli po indukcji, gdzie hodowla indukowana tetracykliną wykazuje wyraźne różowe zabarwienie (z prawej strony zdjęcia) w porównaniu do hodowli kontrolnej, nieindukowanej (z lewej strony zdjęcia).

Przykład 8. Izolowanie rekombinantowych białek BChE.

W przykładowej realizacji zaprezentowanej na Fig. 11, 12 i 13 zaprezentowano wyniki procedury izolowania rekombinantowej wersji skróconej BChE, wskazanej w Przykładach 1, 2, 3, 4, 6, 7. Identyczną procedurę stosowano dla wersji holoenzymu BChE, wskazanej w Przykładach 1, 3, 5, 6, 7. W przykładowej realizacji wykonano preparatykę w skali laboratoryjnej ze 100 ml supernatantu z indukowanej tetracykliną hodowli komórek *Leishmania tarentolae* T7-TR, transformowanych kasetami ekspresyjnymi BChE. Procedura jest bezpośrednio skalowalna do procesu przemysłowego, po zastosowa-

niu bioreaktorów, wirówek i układów chromatograficznych o odpowiedniej, wymaganej skalowaniem objętości. 100 ml supernatantu odwirowanej hodowli przefiltrowano przez filtr mikrobiologiczny o średnicy porów 0,22 μm , celem usunięcia pozostałości komórek *Leishmania tarentolae* T7-TR i ich fragmentów. Do przesączu, schłodzonego do 4°C dodano krystalicznego siarczanu amonowego do uzyskania nasyconego roztworu, precypitując białka zawarte w przesączu. Zawiesinę wirowano przy 20000 g przez 30 min w temperaturze 4°C, supernatant odrzucono, a osad sprecypitowanych białek rozpuszczono w 10 ml buforu A do chromatografii metalopowinowactwa: 50 mM NaH_2PO_4 300 mM NaCl, 10 mM imidiazol, pH 8.0. Rozpuszczone w buforze białka naniesiono na 4 ml złożę, zawierającego chelatowane jony niklu (II) (Sigma, USA). Kolumnę, umocowaną w systemie chromatograficznym Hitachi-Merck, płukano 20 ml buforu A, następnie płukano 20 ml buforu B do chromatografii metalopowinowactwa (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM imidiazol, pH 8.0.), zawierającym zwiększone stężenie eluenta – imidiazolu, celem elucji słabo związanych białek zanieczyszczających, nie opatrzonych znacznikiem 6-ciu reszt His. Poziom wypłukiwania zanieczyszczeń oraz następnej elucji BChE monitorowano zainstalowanym w systemie chromatograficznym on-line monitorem UV przy długości fali 280 nm. Po osiągnięciu niskiego i stałego poziomu absorbancji przy 280 nm, związane do złoża chromatograficznego rekombinantowe białko BChE eluowano buforem C: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 500 mM imidiazol, pH 8.0. Zbierano frakcje o objętości 1 ml i analizowano za pomocą elektroforezy denaturującej SDS-PAGE w 8% żelu poliakrylamidowym. Żel wybarwiono Commassie Brilliant Blue, obserwując we frakcjach elucji (ścieżki 2–5) zabarwione prążki białkowe odpowiadające wielkością oczekiwanej dla skrócone wersji rekombinantowej BChE, jak wskazano w Przykładach 2, 4, 6 i 7. Na elektroforegramie w Fig. 11 ścieżka M zawiera standardy masy cząsteczkowej białek Perfect Protein Ladder (EURx, Poland), ścieżka 1, wyciek z kolumny podczas płukania buforem B. Na Fig. 11 wskazano analizę frakcji z elucji rekombinantowej BChE z złoża chromatograficznego, zawierającego chelatowane jony niklu (II). Ewidentnie obserwowany jest pojedynczy prążek białkowy, dominujący elektroforegram w ścieżkach 2 i 3, zawierający wysoce oczyszczoną, homogeną, rekombinantową BChE. Analogiczne porównawcze eksperymenty wykonano z użyciem klonów, zawierających pełnej długości geny BChE, zawierające naturalne końskie sygnały sekrecyjne wskazane w Przykładzie 3 i na Fig. 3. Uzyskane poziomy ekspresji pozwalały na wykrycie aktywności enzymatycznej BChE testem funkcjonalnym Ellmana, był jednak kilkudziesięciokrotnie niższe w porównaniu do ekspresji skróconej wersji BChE, opatrzonej sygnałem sekrecyjnym *Leishmania*, co wskazuje na istotną rolę użycia sygnału sekrecyjnego *Leishmania* w prezentowanych wynalazku. Fig. 12 obrazuje porównanie czystości uzyskanego preparatu BChE do czystości dostępnych komercyjnie preparatów BChE: w ścieżce M uwidoczniono standardy masy cząsteczkowej białek Perfect Protein Ladder, w ścieżce 1 uwidoczniono preparat BChE firmy Sigma-Aldrich (USA), w ścieżce 2 uwidoczniono preparat BChE firmy Biomed Lublin (Polska). Ewidentna jest bezprecedensowa czystość preparatu rekombinantowej BChE, uzyskanej w przykładowej realizacji w Przykładzie 8. Celem ostatecznej walidacji identyczności otrzymanego preparatu białkowego z zaprojektowaną, zsyntetyzowaną, sklonowaną i ekspymowaną w Przykładach 2, 4, 6 i 7 rekombinantową BChE, przeprowadzono analizę Western Blotting, elektrotransferując białka z 8% żelu SDS-PAGE na membranę PVDF przez 60 min przy natężeniu prądu 100 mA w buforze do transferu: 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicyna, 10% metanol, 0,1% SDS. Następnie membranę nitrocelulozową płukano w buforze TBS (50 mM Tris pH 7,5, 0,5 M NaCl) i blokowano przez 16 godzin w buforze TBS z dodatkiem 3% odtłuszczonego mleka w temperaturze 4°C. Następnie membranę nitrocelulozową inkubowano z komercyjnymi króliczymi przeciwciałami poliklonalnymi (Santa Cruz Technology, USA) stosując rozcieńczenie 1:500, przez 1 godzinę i płukano trzykrotnie w buforze TBS. Immunodetekcję związanych pierwszorzędowych przeciwciał wykonano stosując inkubację przez 1 godzinę z II rzędowymi anty-króliczymi przeciwciałami (rozcieńczenie 1:2000) sprzężonymi z alkaliczną fosfatazą, a następnie przeprowadzono reakcję barwną za pomocą roztworu substratów: soli tetrazolowej nitroblękitu (NBT) oraz 5-bromo 4-chloro 3-indylo fosforanu (BCIP), dającymi ciemnoniebieską barwę w miejscu wiązania sprzężonych przeciwciał. W przykładowej realizacji zaprezentowanej na Fig. 13 widoczny jest specyficzny sygnał immunodetekcji w oczekiwanej pozycji migracji prążka rekombinantowego, fuzyjnego białka GA-BChE-His (oznaczonej czarną strzałką) w 8% żelu SDS-PAGE.

Przykład 9. Funkcjonalne testy enzymologiczne rekombinantowych BChE.

Rekombinantowy enzym GA-BChE-His, otrzymany w przykładowej realizacji zaprezentowanej na Fig. 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 i wskazanej w Przykładach 2, 4, 6, 7 i 8 poddano funkcjonalnym testom enzymatycznym, ukazano funkcjonalne testy enzymatyczne rekombinantowej BChE wskazanej w Przykładach 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8. Uzyskany preparat rekombinantowej skróconej wersji BChE o stężeniu

5 mg/ml poddano analizie aktywności enzymatycznej metodą Ellmana. Metoda opiera się na pomiarze barwnego produktu reakcji, który powstaje w wyniku hydrolizy jodku S-butyrylotiocholiny przez BChE do tiocholiny, która z kolei reaguje z DTNB (kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy), dając barwny produkt. Maximum absorbancji znajduje się przy długości fali 412 nm. Uwzględniając molowy współczynnik absorbancji barwnego produktu, którego stężenie jest równe stężeniu rozłożonego przez BChE substratu, można ilościowo ustalić aktywność enzymatyczną BChE. W przykładowej realizacji zaprezentowanej na Fig. 14, 15, 16 i 17 pomiary aktywności białka BChE prowadzono na płytkach 96-dołkowych w czytniku płytek TECAN Infinity M200Pro, mierząc absorbancję przy 412 nm co 1 min. Wyniki dla preparatu białka GA-BChE-His, a także dla standardu z zestawu firmy Arbor Assay (USA) wskazują na aktywność enzymatyczną oczyszczonego preparatu rekombinantowego białka GA-BChE-His na wysokim poziomie, wynoszącym 270 U/mg. Ponadto, wykonano szczegółową charakterystykę enzymatyczną, wykreślając krzywą Michaelisa-Menten, uwidocznioną na Fig. 15, na podstawie której ustalono stałą Michaelisa (K_m) wynoszącą 20 μ M dla jodku S-butyrylotiocholiny. Reakcje enzymatyczne przeprowadzano w temperaturze 25°C w 100 mM buforze fosforanowym o pH 7,4. Znakomita większość specyficznych inhibitorów opisanych i używanych w pracach nad charakterystyką aktywności enzymatycznej ChE i BChE jest silnie toksyczna, niektóre z nich są zaliczane do BST, wymagającymi pracy w atestowanych laboratoriach. Zatem celem weryfikacji specyficzności substratowej uzyskanej rekombinantowej BChE zbadano wpływ opisanego w literaturze inhibitora BChE, o relatywnie niskiej toksyczności – błękitu metylenowego. W przykładowej realizacji zaprezentowanej na Fig. 16 przeprowadzono pomiary aktywności BChE w obecności różnych stężeń błękitu metylenowego. Reakcja katalizowana przez BChE ulega inhibicji wraz ze wzrostem stężenia błękitu metylenowego. W każdym pomiarze użyto 10 ng oczyszczonego białka oraz błękit metylenowy w stężeniach 25 μ M, 12,5 mM, 6,25 mM, 2,5 mM, 0 mM. Uzyskane wyniki potwierdziły działanie inhibicyjne błękitu metylenowego, tym samym dodatkowo potwierdzając, że sklonowane i eksprymowane w *Leishmania tarentolae* T7-TR białko jest faktycznie funkcjonalnym enzymem GA-BChE-His, wykazującym aktywność opisanych w literaturze BChE. Enzymy ChE i BChE klonowane i eksprymowane w mikroorganizmie *Leishmania tarentolae* mogą znaleźć szereg obecnych i przyszłych zastosowań: jako antidotum przykładowo, ale nie wyłącznie, na ekspozycję na bojowe środki trujące, pestycydy, inne trucizny, jady węży, ryb, innych kręgowców, owadów, innych bezkręgowców, narkotyki, leki; jako leki lub substancje do testowania leków (np. inhibitorów BChE i ChE) przeznaczone do leczenia chorób neurodegeneracyjnych, przykładowo, ale nie wyłącznie choroby Alzheimera, demencji, alkoholizmu, narkomanii, uszkodzeń pourazowych układu nerwowego; jako komponenty biosensorów wykrywających przykładowo, ale nie wyłącznie, BST, pestycydy, trucizny przemysłowe, narkotyki.

Wykaz sekwencji

MASRLVRVLAAAMLVAAAVSVDAGAEEDIIITTKNGKVRGMNLPVLGGTVTAFLGIPY
 AQPPLGRLRFKKPQSLTKWSNIWNATKYANSCYQNTDQSFPGFLGSEMWNPNTELS
 CLYLNWVWPAPKPKNATVMIWIYGGGFQGTSSLPVYDGKFLARVERVIVVSMNYRVG
 ALGFLALSENPEAPGNMGLFDQQLALQWVQKNIAAFGGNPRSVTLFGESAGAASVSLH
 LLSPRSQPLFTRAILQSGSSNAPWAVTSLYEARNRTLTLAKRMGCSRDNETEMIKCLR
 DKDPQEILLNEVFVVPYDTLLSVNFGPTVDGDFLTDMPDTLLQLGQFKRTQILVGVNK
 DEGTAFLVYGAPGFSKDNNIIITRKEFQEGFKIFFPRVSEFGRESILFHYMDWLDDQR
 AENYREALDDVVG DYNIICPALEFTKKFSELGND AFFYYFEHRSTKLPWPEWMGVMHG
 YEIEFVFGPLPLERRVNYTKAEIILSRSIMKRWANFAKYGNPNGTQSNSTRWPVFKSTE
 QKYLTLNTESPKVYTKLRAQQCRFWTLFFPKVLKGTHHHHHH

Seq.1

GAEEDIIITTKNGKVRGMNLPVLGGTVTAFLGIPYAQPPLGRLRFKKPQSLTKWSNIW
 NATKYANSCYQNTDQSFPGFLGSEMWNPNTELSCLYLNWVWPAPKPKNATVMIWIY
 GGGFQGTSSLPVYDGKFLARVERVIVVSMNYRVGALGFLALSENPEAPGNMGLFDQQ
 LALQWVQKNIAAFGGNPRSVTLFGESAGAASVSLHLLSPRSQPLFTRAILQSGSSNAP
 WAVTSLYEARNRTLTLAKRMGCSRDNETEMIKCLRDKDPQEILLNEVFVVPYDTLLSV
 NFGPTVDGDFLTDMPDTLLQLGQFKRTQILVGVNKDEGTAFLVYGAPGFSKDNNIIIT
 RKEFQEGMKIFFPRVSEFGRESILFHYMDWLDDQRAENYREALDDVVG DYNIICPALE
 FTKKFSELGND AFFYYFEHRSTKLPWPEWMGVMHGYEIEFVFGPLPLERRVNYTKAEI
 LSRSIMKRWANFAKYGNPNGTQSNSTRWPVFKSTEQKYLTLNTESPKVYTKLRAQQCR
 FWTLFFPKVLKGTHHHHHH

Seq.2

GAAGAAGACATCATCATCACCACCAAAAACGGTAAAGTTCGTGGTATGAACCTGCCGG
 TTCTGGGTGGTACCGTTACCGCTTTCTCTGGGTATCCCGTACGCTCAGCCGCCGCTGGG
 TCGTCTGCGTTTCAAAAAACCGCAGTCCCTGACCAAATGGTCCAACATCTGGAACGCT
 ACCAAATACGCTAACTCCTGCTACCAGAACACCGACCGAGTCCCTCCCGGGTTTCTCTGG
 GTTCCGAAATGTGGAACCCGAACACCGAACTGTCCGAAGACTGCCGTGTACCTGAACGT
 TTGGATCCCGGCTCCGAAACCGAAAAACGCTACCGTTATGATCTGGATCTACGGTGGT
 GGTTTCCAGACCGGTACCTCCTCCCTGCCGGTTTACGACGGTAAATTCTCTGGCTCGTG
 TTGAACGTGTTATCGTTGTTTCCATGAACTACCGTGTTGGTGCTCTGGGTTTCTCTGGC
 TCTGTCCGAAAACCCGGAAGCTCCGGGTAACATGGGTCTGTTTCGACCAGCAGCTGGCT
 CTGCAGTGGGTTTCAAGAAAACATCGCTGCTTTCCGGTGGAACCCGCGTTCCGTTACCC
 TGTTCCGGTGAATCCGCTGGTGCTGCTTCCGTTTCCCTGCACCTGCTGTCCCGCGCTTC
 CCAGCCGCTGTTTCAACCGTGCTATCCTGCAGTCCGGTTCTTCCAACGCTCCGTGGGCT
 GTTACCTCCCTGTACGAAGCTCGTAACCGTACCCTGACCCTGGCTAAACGTATGGGTT
 GCTCCCGTGACAACGAAACCGAAATGATCAAATGCCTGCGTGACAAAGACCCGCAGGA
 AATCCTGCTGAACGAAGTTTTCGTTGTTCCGTACGACACCCCTGCTGTCCGTAACTTC
 GGTCCGACCGTTGACGGTGACTTCTGACCGACATGCCGGACACCCCTGCTGCAGCTGG
 GTCAGTTCAAACGTACCCAGATCCTGGTTGGTGTTAACAAAGACGAAGGTACCGCTTT
 CCTGGTTTACGGTGCTCCGGGTTTCTCCAAAGACAACAACCTCCATCATCACCCGTAAA
 GAATTCAGGAAGGTCTGAAAATCTTCTTCCCGCGTGTTCGGAATTCGGTCTGTAAT
 CCATCCTGTTTCCACTACATGGACTGGCTGGACGACCGAGCTGCTGAAAACCTACCGTGA
 AGCTCTGGACGACGTGTTGGTGACTACAACATCATCTGCCCGGCTCTGGAATTCACC
 AAAAAATTCTCCGAACCTGGGTAACGACGCTTTCTTCTACTACTTCGAACACCGTTCCA

CCAAACTGCCGTGGCCGGAATGGATGGGTGTTATGCACGGTTACGAAATCGAATTTCGT
 TTTTCGGTCTGCCGCTGGAACGTCGTGTTAACTACACCAAAGCTGAAGAAATCCTGTCC
 CGTTCCATCATGAAACGTTGGGCTAACTTCGCTAAATACGGTAACCCGAACGGTACCC
 AGTCCAACCTCCACCCGTTGGCCGGTTTTCAAATCCACCGAACAGAAATACCTGACCCT
 GAACACCGAATCCCCGAAAGTTTACACCAAACCTGCGTGCTCAGCAGTGCCGTTTCTGG
 ACCCTGTTCTTCCCCGAAAGTT

Seq.3

MAMQSWGTTICIRILLRFLLLWVLIGNSHTEEDIIITTKNGKVRGMNLPVLGGTVTAF
 LGIPYAQPPLGRLRFKKPQSLTKWSNIWNATKYANSCYQNTDQSFPGFLGSEMWNPN
 ELSEDCLYLNWVWPAPKPKNATVMIWIYGGGFQTGTSSLPVYDGKFLARVERVIVVSM
 NYRVGALGFLALSENPEAPGNMGLFDQQLALQWVQKNIAAFGGNPRSVTLFGESAGAA
 SVSLHLLSPRSQPLFTRAILQSGSSNAPWAVTSLYEARNRTLTLAKRMGCSRDNEM
 IKCLRDKDPQEILLNEVFVVPYDTLLSVNFGPTVDGDFLTDMPTLLQLGQFKRTQIL
 VGVNKDEGTAFLVYGAPGFSKDNNSIITRKEFQEGGLKIFFPRVSEFGRESILFHYMDW
 LDDQRAENYREALDDVVG DYNIICPALEFTKKFSELGNDAFFYYFEHRSTKLPWPEWM
 GVMHGYEIEFVFGPLPLERRVNYTKAEIILSRSIMKRWANFAKYGNPNGTQSNSTRWPV
 FKSTEQKYLTNTESPKVYTKLRAQQCRFWTLFFPKVLELTGNIDEAEREWKAGFHRW
 NNYMMDWKNQFNDYTSKKESCSDFLKGTHHHHHH

Seq.4

EEDIIITTKNGKVRGMNLPVLGGTVTAF LGIPYAQPPLGRLRFKKPQSLTKWSNIWNA
 TKYANSCYQNTDQSFPGFLGSEMWNPNTELSEDCLYLNWVWPAPKPKNATVMIWIYGG
 GFQTGTSSLPVYDGKFLARVERVIVVSMNYRVGALGFLALSENPEAPGNMGLFDQQLA
 LQWVQKNIAAFGGNPRSVTLFGESAGAA SVSLHLLSPRSQPLFTRAILQSGSSNAPWA
 VTSLYEARNRTLTLAKRMGCSRDNEMIKCLRDKDPQEILLNEVFVVPYDTLLSVNF
 GPTVDGDFLTDMPTLLQLGQFKRTQILVGVNKDEGTAFLVYGAPGFSKDNNSIITRK
 EFQEGGLKIFFPRVSEFGRESILFHYMDWLDDQRAENYREALDDVVG DYNIICPALEFT
 KKFSELGNDAFFYYFEHRSTKLPWPEWMGVMHGYEIEFVFGPLPLERRVNYTKAEIILS
 RSIMKRWANFAKYGNPNGTQSNSTRWPVFKSTEQKYLTNTESPKVYTKLRAQQCRFW
 TLFFPKVLELTGNIDEAEREWKAGFHRWNNYMDWKNQFNDYTSKKESCSDFLKGTHH
 HHHH

Seq.5

TAGCCATGGCCATGCAGAGCTGGGGTACAATCATATGCATTCTCGAATTCTCTTGCATT
 TCTTCTGCTCTGGGTGCTTATCGGGAACACACACTGAAGAAGACATCATAATTACA
 ACCAAGAACGGAAGTCAGAGGGATGAACTTGCCAGTTCTTGGTGGCACAGTAACAG
 CCTTCTTGGGATTCCCTATGCACAGCCGCCTCTTGGTAGACTTCGATTCAAAAAGCC
 ACAATCCTTGACTAAGTGGTCCAATATTTGGAATGCCACAAAATATGCCAATTCTTGC
 TATCAGAACACAGATCAAAGTTTCCAGGCTTCCTTGGATCAGAGATGTGGAACCCAA
 ACACTGAACTTAGTGAAGACTGTTTATATCTGAATGTGTGGATTCCAGCACCTAAACC
 AAAAAATGCTACTGTAATGATATGGATCTATGGTGGTGGTTTTCAAACCTGGGACATCA
 TCTTTGCCTGTTTATGATGGCAAGTTTCTGGCTCGGGTTGAAAGAGTTATTGTAGTTT
 CAATGAACTATAGAGTGGGTGCCCTAGGATTCTTAGCCTTATCAGAAAATCCTGAGGC
 ACCAGGGAACATGGGCTTATTTGATCAACAGTTGGCACTTCAGTGGGTCCAAAAAAT

ATAGCAGCCTTTGGTGGTAATCCTAGAAAGTGTAACCTCTCTTTGGAGAAAGTGCAGGAG
 CAGCTTCAGTTAGCCTTCATTTACTTTCTCCTAGAAGCCAGCCTTTGTTTACCAGAGC
 CATTCTGCAAAGTGGATCCTCTAATGCCCCTTGGGCAGTAACATCTCTGTATGAAGCT
 AGGAACAGAACATTGACCCTAGCTAAACGTATGGGTTGCTCTAGGGACAATGAGACTG
 AGATGATCAAATGTCTTCGAGACAAAGATCCCCAGGAAATCTTCTGAATGAAGTATT
 TGTGTCCCCCTATGATACTCTCTTGTCTAGTAAACTTTGGTCCAACCTGTGGATGGCGAT
 TTTCTCACTGACATGCCAGATACTACTCCAACCTTGGACAGTTCAAAAGAACCCAGA
 TCTTGGTGGGTGTTAATAAAGATGAAGGGACAGCATTTTTTAGTATATGGGGCTCCTGG
 TTTCAGCAAAGATAACAACAGTATCATAACAAGAAAAGAATTTTCAGGAGGGTTTAAAA
 ATATTTTTTTCCAAGAGTGAGTGAGTTTGGGAAGAGAATCAATCCTTTTTCCATTACATGG
 ACTGGTTAGATGATCAGAGAGCCGAAAACCTACAGAGAGGCCCTTGGATGATGTTGTITGG
 GGATTACAATATCATATGCCCTGCCTTGGAGTTTACCAAAAAAGTTCTCAGAATTGGGA
 AATGATGCCTTTTTTCTACTATTTTTGAACACCGATCGACCAAACCTTCCTTGGCCAGAAT
 GGATGGGAGTGATGCATGGTTACGAAATCGAATTTGTCTTTGGTTTACCTCTGGAAAG
 AAGAGTTAATTACACAAAAGCTGAGGAAATTTTGAGTAGATCCATTATGAAACGCTGG
 GCAAATTTTGCAAATATGAAATCCAAATGGGACCCAGAGCAATAGCACAAAGATGGC
 CTGTCTTCAAGAGCACTGAACAAAAATATTTAACCTTGAATACAGAGTCACCAAAAGT
 GTACACCAAACCTACGAGCTCAACAATGTCTGATTCTGGACACTATTTTTTCTTAAAGTC
 TTGGAATTGACAGGAAATATTGATGAAGCAGAACGAGAATGGAAAGCAGGATTCATC
 GCTGGAACAATTACATGATGGACTGGAATAATCAATTTAACGATTACACTAGCAAGAA
 AGAAAGCTGTTTCAGATTTTCTTAAGAGT

Seq.6

TAGCCATGGCCATGCAGTCCTGGGGTACCATCATCTGCATCCGTATCCTGCTGCGTTT
 CCTGCTGCTGTGGGTTCTGATCGGTAACCTCCACACCGAAGAAGACATCATCACC
 ACCAAAAACGGTAAAGTTTCGTGGTATGAACCTGCCGGTTCTGGGTGGTACCGTTACCG
 CTTTCTGCGGTATCCCGTACGCTCAGCCGCCGTGGGTGCTCTGCGTTTCAAAAAACC
 GCAGTCCCTGACCAAATGGTCCAACATCTGGAACGCTACCAAATACGCTAACTCCTGC
 TACCAGAACACCGACCAGTCCTTCCCGGGTTTCTGGGTTCGAAATGTGGAACCCGA
 ACACCGAACTGTCCGAAGACTGCCTGTACCTGAACGTTTGGATCCCGGCTCCGAAACC
 GAAAAACGCTACCGTTATGATCTGGATCTACGGTGGTGGTTTCCAGACCGGTACCTCC
 TCCCTGCCGGTTTACGACGGTAAATTCCTGGCTCGTGTTGAACGTGTTATCGTTGTTT
 CCATGAACTACCGTGTGGTGCTCTGGGTTTCTGGCTCTGTCCGAAAACCCGGAAGC
 TCCGGGTAAACATGGGTCTGTTCCGACCAGCAGCTGGCTCTGCAGTGGGTTTCAGAAAAAC
 ATCGCTGCTTTTCGGTGGTAACCCGCGTTCCGTTACCCTGTTCCGGTGAATCCGCTGGTG
 CTGCTTCCGTTTCCCTGCACCTGCTGTCCCCGCGTTCCCAGCCGCTGTTACCCGCTGC
 TATCCTGCAGTCCGGTTCCCTCCAACGCTCCGTGGGCTGTTACCTCCCTGTACGAAGCT
 CGTAACCGTACCCTGACCCTGGCTAAACGTATGGGTTGCTCCCGTGACAACGAAACCG
 AAATGATCAAATGCCTGCGTGACAAAGACCCGCAGGAAATCCTGCTGAACGAAGTTTTT
 CGTTGTTCCGTACGACACCCTGCTGTCCGTAACTTCGGTCCGACCGTTGACGGTGAC
 TTCCTGACCGACATGCCGGACACCCTGCTGCAGCTGGGTGAGTTCAAACGTACCCAGA
 TCCTGGTTGGTGTAAACAAAGACGAAGGTACCGCTTTCCTGGTTTACGGTGCTCCGGG
 TTTCTCCAAAGACAACAACCTCCATCATCACCCGTAAAGAATTCAGGAAGGTCTGAAA
 ATCTTCTTCCCGCGTGTTTCCGAATTCGGTCTGTAATCCATCCTGTTCCACTACATGG
 ACTGGCTGGACGACGAGCGTGCTGAAAACCTACCGTGAAGCTCTGGACGACGTTGTTGG
 TGACTACAACATCATCTGCCCGGCTCTGGAATTCACCAAAAAATTCCTCCGAACTGGGT
 AACGACGCTTTCCTTCTACTACTTCGAACACCGTTCCACCAAACCTGCCGTGGCCGGAAT
 GGATGGGTGTTATGCACGGTTACGAAATCGAATTCGTTTTCGGTCTGCCGCTGGAACG
 TCGTGTTAACTACACCAAAGCTGAAGAAATCCGTGTCCTGTTCCATCATGAAACGTTGG

GCTAACTTCGCTAAATACGGTAACCCGAACGGTACCCAGTCCAACTCCACCCGTTGGC
CGGTTTTCAAATCCACCGAACAGAAATACCTGACCCTGAACACCGAATCCCCGAAAGT
TTACACCAAACCTGCGTGCTCAGCAGTGCCGTTTCTGGACCCTGTTCTTCCCGAAAGTT
CTGGAAC TGACCGGTAACATCGACGAAGCTGAACGTGAATGGAAAGCTGGTTTCCACC
GTTGGAACAAC TACATGATGGACTGGAAAAACAGTTCAACGACTACACCTCCAAAAA
AGAATCCTGCTCCGACTTCCTTAAGAATA

Seq.7

ATAGTCGACGCTGGCGCCGAAGAAGACATCATCATCACCACCAAAAACGGTAAAGTTC
GTGGTATGAACCTGCCGTTTCTGGGTGGTACCGTTACCGCTTTCCTGGGTATCCCGTA
CGCTCAGCCGCCGCTGGGTCTGCGTTTCAAAAAACCGCAGTCCCTGACCAAATGG
TCCAACATCTGGAACGCTACCAAATACGCTAACTCCTGCTACCAGAACACCGACCAGT
CCTTCCCGGGTTTCTGGGTTCGGAAATGTGGAACCCGAACACCGAAGTGTCCGAAGA
CTGCCTGTACCTGAACGTTTGGATCCCGGCTCCGAAACCGAAAAACGCTACCGTTATG
ATCTGGATCTACGGTGGTGGTTTCCAGACCGGTACCTCCTCCCTGCCGGTTTACGACG
GTAAATTCCTGGCTCGTGTTGAACGTGTTATCGTTGTTTCCATGAAC TACCGTGTGG
TGCTCTGGGTTTCTTGGCTCTGTCCGAAAACCCGGAAGCTCCGGGTAAACATGGGTCTG
TTCGACCAGCAGCTGGCTCTGCAGTGGGTTCAGAAAAACATCGCTGCTTTCGGTGGTA
ACCCGCGTTCCGTTACCTGTTCGGTGAATCCGCTGGTGCTGCTTCCGTTTCCCTGCA
CCTGCTGTCCCCGCGTTCCCAGCCGCTGTTCAACCGTGCTATCCTGCAGTCCGGTTCC
TCCAACGCTCCGTGGGCTGTTACCTCCCTGTACGAAGCTCGTAACCGTACCTGACCC
TGGCTAAACGTATGGGTTGCTCCCGTGACAACGAAACCGAAATGATCAAATGCCTGCG
TGACAAAGACCCGCAGGAAATCCTGCTGAACGAAGTTTTCGTTGTTCCGTACGACACC
CTGCTGTCCGTTAACTTCGGTCCGACCGTTGACGGTGAATTCCTGACCGACATGCCGG
ACACCCTGCTGCAGCTGGGTGAGTTCAAACGTACCCAGATCCTGGTTGGTGTAAACAA
AGACGAAGGTACCGCTTTCCTGGTTTACGGTGCTCCGGGTTTCTCCAAAGACAACAAC
TCCATCATCACCCGTAAAGAATTCCAGGAAGGTCTGAAAATCTTCTTCCCGCGTGTTT
CCGAATTCGGTCTGTAATCCATCCTGTCCACTACATGGACTGGCTGGACGACCAGCG
TGCTGAAAAC TACCGTGAAGCTCTGGACGACGTTGTTGGTGACTACAACATCATCTGC
CCGGCTCTGGAATTCACCAAAAAATTCTCCGAACTGGGTAAACGACGCTTCTTCTACT
ACTTCGAACACCGTTCCACCAAAC TCCGTGGCCGGAATGGATGGGTGTTATGCACGG
TTACGAAATCGAATTCGTTTTCGGTCTGCCGCTGGAACGTCGTGTTAACTACACCAA
GCTGAAGAAATCCTGTCCCGTTCCATCATGAAACGTTGGGCTAACTTCGCTAAATACG
GTAACCCGAACGGTACCCAGTCCAAC TCCACCCGTTGGCCGGTTTTCAAATCCACCGA
ACAGAAATACCTGACCCTGAACACCGAATCCCCGAAAGTTTACACCAAAC TCGTGCT
CAGCAGTGCCGTTTCTGGACCCTGTCTTCCCGAAAGTTCTTAAGAAT

Seq.8

ATTTAAATGAATACTTACAAGGTACTCCTGCACCCGGCACAAGCGTATGTAATTGCTA
GCACGCCGGTGCCGACCCAACCTCCAAC TCCCGTGCTCACGCGCGCACACACGCACGC
ACAAGCATCATCATCATCATCATCATGGTCATCCCTCCCTTATCTGGCGAAGGAGGCA
CTGTGACGCAAGGTTTTCTGTGTCTCTCCTACCCCTCTACTGATTCCTTCTTTCTCTC
TTCCCTCTTCTCGCACTGCACCCCCCTCCCCCCCCACACACACACACTTGCTGTCAT
GGCTGTGCGCATTCGCTCACTCTTGTCGTGTCCCGTTTCCCTCATGGCGTCGTGCTCT
TCCCCTGCGCAACCAACCCACGCTGCACACGCACGCTCCACAGCGCGCTTCGCCTTCTT

CGCTCTCTCCCTAGCCTCTCTGTCAACCTCCACTGCCGCCGCGGTTGGCCGCTCT
GCATCCTTTTCCCGCAGCCTTTCTTTTTTTTTTTTCACTGTCAGTCTGGCTCATACCCG
TGGAGCTGTGTCTCCCCGAGCTTCCCATACACCCACCCCCACGACCTTTCTCAGCTT
CCTTTCTCAGTCGCTTGAGCACGCAGTGCATTCACTTCTTCGTCCTCAGTTTCGCCTC
GCTCTCGCTCTCTCTCGCGCGCGCTGCCGTACCCGCCCTCCTCGTACTCCCTCCTT
CCTCATCCCCACCCCCCGTGTGCGCCGGCTCCTCTCTGAATTCTAATACGACTCAC
TATAGGGAGATCGTCCCTATCAGTGATAGAGATCCAGTCGCAGCCTGACCGCATCACA
CATCAAGGCGTTACAGCCTCTCCGTCTTTGCTGCACCCAAGTGTATTCTGTGTGACCG
GTTGAGGGATCTAATGGATTTCGGAACCTTTGGTCGTTTGGTCTCTCATGCTGCCCAAT
CCATGCGCTTTTCTCCGTGCCTCTCTGTCTCCCCTTCCGTTCTATTTGGACAACGATG
TGTACTGTAATGCGTGCGCCATCTGACAACGAATAGATCAGCAGCATTCGCACACTTG
CACATACCCACTGAAGCTTTTGTGTCTGTCTGATTGACAACACCGACTGCAACAAGGT
GTAGATAGAAGTTGGCCTTCTCGCTCGCTCGCACGCTCTTCACGCTCCTGCTTTCCTT
GCTGTGCCTTGCCACCAGATCTGCCATGSCCTCGAGGCTCGTCCGTGTGCTGGCCGCC
GCCATGCTGGTTGCAGCGGCCGTGTGCGTCGACGCTGGCGCCGAAGAAGACATCATCA
TCACCACCAAAAACGGTAAAGTTCTGTGGTATGAACCTGCCGGTTCTGGGTGGTACCGT
TACCGCTTTCTGGGTATCCCGTACGCTCAGCCGCCGCTGGGTGCTCTGCGTTTCAA
AAACCGCAGTCCCTGACCAAATGGTCCAACATCTGGAACGCTACCAAATACGCTAACT
CCTGCTACCAGAACACCGACCAAGTCTTCCCAGGTTTCTGGGTTCGGAAATGTGGAA
CCCGAACACCGAACTGTCCGAAGACTGCCTGTACCTGAACGTTTGGATCCCGGCTCCG
AAACCGAAAAACGCTACCGTTATGATCTGGATCTACGGTGGTGGTTTCCAGACCGGTA
CCTCCTCCCTGCCGTTTTACGACGGTAAATTCCTGGCTCGTGTGTAACGTGTTATCGT
TGTTTTCCATGAACCTACCGTGTGTTGGTGTCTGGGTTTTCTGGCTCTGTCCGAAAAACCG
GAAGCTCCGGGTAAACATGGGTCTGTTTCGACCAGCAGCTGGCTCTGCAGTGGGTTCAGA
AAAACATCGCTGCTTTTCGGTGGTAACCCGCGTTCCGTTACCCTGTTCCGGTGAATCCGC
TGGTGTCTGCTTCCGTTTCCCTGCACCTGCTGTCCCCGCGTTCCCGAGCCGCTGTTCCAC
CGTGTCTATCCTGCAGTCCGGTTCCCTCCAACGCTCCGTGGGCTGTTACCTCCCTGTACG
AAGCTCGTAACCGTACCCTGACCCTGGCTAAACGTATGGGTTGCTCCCGTGACAACGA
AACCAGAAATGATCAAATGCCTGCGTGACAAAGACCCGCAGGAAATCCTGTGTAACGAA
GTTTTCTGTTGTTCCGTACGACACCCTGCTGTCCGTTAACTTCGTTCCGACCGTTGACG
GTGACTTCCTGACCGACATGCCGGACACCCTGCTGCAGCTGGGTGAGTTCAAACGTAC
CCAGATCCTGGTTGGTGTTAACAAAGACGAAGGTACCGCTTTCCTGGTTTACGGTGTCT
CCGGGTTTTCTCAAAGACAACAACCTCCATCATCACCCGTAAAGAATTCCAGGAAGGTC
TGAAAATCTTCTTCCCGCGTGTTCGGAATTCGGTGTGAATCCATCCTGTTCCACTA
CATGGACTGGCTGGACGACCGAGCTGCTGAAAACCTACCGTGAAGCTCTGGACGACGTT
GTTGGTGACTACAACATCATCTGCCCGGCTCTGGAATTCACCAAAAAATTCCTCGAAC
TGGGTAACGACGCTTTCTTCTACTACTTCGAACACCGTTCCACCAAACCTGCCGTGGCC
GGAATGGATGGGTGTTATGCACGGTTACGAAATCGAATTCGTTTTCCGGTCTGCCGCTG
GAACGTGCTGTTAACTACACCAAAGCTGAAGAAATCCTGTCCCGTTCCATCATGAAAC
GTTGGGCTAACTTCGCTAAATACGGTAACCCGAACGGTACCCAGTCCAACCTCCACCCG
TTGGCCGGTTTCAAATCCACCGAACAGAAATACCTGACCCTGAACACCGAATCCCCG
AAAGTTTACACCAAACCTGCGTGCTCAGCAGTGCCGTTTTCTGGACCTGTTCTTCCCGA
AAGTTCTTAAGGGTACCCACCACCATCACCACCACTAGGCGGCCGCCCTCCTCCTCCT
TTCTTGTTTCTTTACGTCGCCCTTCTCGGTTGTAGCTGGCAGACGACGAGTCTTACTT
TTACGTGTACTTCTCTATAGATGATGTATGATCTCTCTGCATGCGTGTTCGTGCATGT
GTCCGTGTGTTGTGTACGCGTGCGTCTCGCCTCAGCTCTCCGCGTGAAAGGGTTTTGAC
TGCCCATGATGCGTGTGTATATCCACGCGCAGGCACGCACACACACACACACACAC
ACACACAGGCACACACAGGCACACAAACGCATCTCAGGCCGAGCCGCATACGTCTCTC
GCACGGTCTCGTTTTATTTGATCATGTAGTTGAGTATTAAATTGGGAAGACAAAAACAT
AATAGCACGAAGAGTCGGGCACGAAAAGCCCCGATCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTCGCG
CAGGGGCGGTGTGGGTGCACGACGACGAGGACGGAGGGGGGAAGGGAGGCATAAACGG

TCGATCCCCCATCGCACATGCGGGTACGAGCATTATCTGCTGTGTCTGGTCCTTTATC
ATATCGCTACCCGCCCGCCCCCGCCCCCTCCCCCCCCCCCCCCCCCGGGCTCCTGT
CACTGTCGTTCTCGGACTCCCCACACACCCGCGCAACGCTCATGTACGAAGAGAAA
AGTAGAAGGCGTGGCGATGCGTTGCGCGGGCCCCCTGTCCGCTGGCATGCAGACGTCGA
GCCGTGGAACGGATGGTAGCGAGAGACAACGCGGCGATGCAGGAAAGGAGATTTACTG
CAGGACGTCTACACACGCGCGCACACCACTGCGAATGGCACCGTGCTGAGGAAAATTG
GGGGGGAGGGCGCACGGGGGGCGGGGCAGGAAACGGTTGGATCAGCAGCACTCTCAACT
TGTGTCCGTATTGCGAAGGAGGGAGAGGAGCCTGCCCCGTATTATGGGCGCTGAAACGT
CGGAACCACCTATGAATCCCACCTTCTGCGTCGCGGAGGCGTACTGCTTCCGACCACCT
CCGCAGCTCACGCGCGTCGAGCTCCCTCCCTTTCCCTTCTTTCCGTTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTCTTGTACGATGCATGGCCATCTCTCCTCCAACCCTCCACGCCCTC
CTCTCCCCCGCCCATCAAACGCGCTACGGCCACAACCATTTCTTCAAGTATCACATCC
ACCACCACCTCTTACCCACCTACCCCTCTTCGACTCTGACACAGCCACTGACGCCCTCTC
CGCCTCTCTCGCTCGCTGCACATTGACTCTCCACAGCCCCCCTCCCTCGCACAGCCA
GCCCCACCCACCCACCCACCCACCCACCGCTCTACACACCTCCACAGCAGCCGGATCC
ACCGCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACC GCGCGCGACGTCGCCGG
AGCGGTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCGTGGAGGACGAC
TTCGCCGGTGTGGTCCGGGACAACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGG
TGGTGCCGGACAACACCCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCCTGGACGAGCTGTACGC
CGAGTGGTTCGGAGGTGCTGTCCACGAACCTCCGGGACGCCCTCCGGGCCGGCCATGACC
GAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGGCGGGAGTTCCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACT
GCGTGCACCTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACGTCGAGTCCGGAATGGTGAGCAAGGGCGA
GGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGC
TCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGG
GCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGA
CATCCTGTCCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGAC
ATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGA
ACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGA
GTTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCCTCCGACGGCCCCGTAATG
CAGAAGAAGACTATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCG
CCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGC
TGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGACGCTGCCCGGCGCCTACAAC
GTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCAACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGT
ACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGAC
TAGTTCTAGTTCTAGGGGCGGAATTAATTCAGATCCTCGTGTGAGCGTTTCGCGGAATC
GGTCGCTCGTGTATATGCCCCGTCTTGGTGTGTGTGCTCGCAAGGCGGTGCAGCAGGATA
CCGTCGCCCTCCTCTCTCCTTGCTTCTCTGTTCTTCAATTCGCGATCTCACAGAGGCC
GGCTGTGCACGCCCTTCTCACCCTCCTTTTCCACCTCTCGGCCACCGGTCGGCTCC
GTTCCGTCTGCCGTCGAGAAGGGACGGGCATGTGCAGCTCCTCCCTTTCTCTCGCGCG
CGCATCTTCTCTTGCTTGTGGCACTCACGCTCATGCGTCAAGGCGGCCCCACGCCGAG
CCCCCTGCGCTCCCTTCCCTCTTGCATCCGTAGCGCGGATGCCGTGATGCGCAAGG
CCGGCATGAAGGAGCGCGTGCCCTCAAGAGGGCACACTATCATGCCCTACGTGGGCCA
CGCAGCGATGAGGCCGGCTTCGGCGGAGATGCGTCACGCACGTGCCAGATGATGCGCT
ACGCCCTTCTTGACTTGCGCCCCCTCTCTTCCCTCCGTCTCTCACTCTCTCTCTCTCA
CACACACACACACACACACACACACAAAGCTCCGGTTTCGTCCGGGGCCCTGCAGGCA
TGCCGACGTTCCGGTGACCTGAACCACCTCGTCGCCGCTGTGATGTCTGGCGTGACCTG
CTGCCCTGCGCTTCCCTGGCCAGCTGAACTCTGACCTGCGCAAGCTTCTCCTGCTCAAC
GACGGCGACGGCGCTGACGAGGTGCAGAGTGGCACAGAAGCCGACGCGGCGTACAGCG
ACGAGGAGGGCGGGAAGTCGCCGAGTGGTCCCCTGGCGAACGACTCCCTGTTTCATGTC
CGCGTGGGACCGCCGTCGCAACCTCACGAGCCGCCCGCTGCGCATCAACAACCATATTC
GGCCCCACCTGCGATTGATGGACTGCATTCTGAAGAAGCAGCCCTTCCCGGAGATGA

AGCTCGGCGACTGGCTTCTAGTGCCAGACATGGGCAGCTACACCACCGCTGCCGCGGG
 AGTCTTCAACGGTTTTCGCGACACGCCGCTTGAGTTTGTGAGCTCTGTTGACTTGTCT
 GCGAGGTTCGAGGGCTGTGCATGCGCATGAGGGCAACACTTTTGAGTTCGTGAGCGAGT
 GAAAACGGGGCTGAGAGGATACAAGGTGCTGTAGGATGAGATCCTCCGCCACCAGAG
 CATGGGCTATCTCTTGTGTCTGTTCTGAGCCTGCCTCTCTCTCTCTCTGCTCCC
 CCTCCCCCTCCCCACACACCCCCACACGCACGCTCTGCGTCACCTCTCTCTCTCTC
 AGTAACGGGAGTAGACATGCAGAAGAAGTATACCACTAATACGTATGCGTTCCCTGCAG
 GCATCCGAGATGGACACCAGAGCAAGCGCGGGTGTGCGCGAGTGGCCAGGAAAGGGGA
 AGAGAGAGAAAGAGAGAGAGACGAAGGAGCGCGTCCCGTCGTTGTGCGTCTTCTGTGG
 TGGCGCATTTAAATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAA
 GGGAAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGC
 GCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCAC
 TTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAAT
 ATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGA
 AGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGCGCATTTTG
 CCTTCTGTTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAG
 TTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGA
 GTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGG
 CGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTAT
 TCTCAGAAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCA
 TGACAGTAAGAGAATTATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAA
 CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATG
 GGGGATCATGTAACCTGCTTGTATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAA
 ACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATT
 AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCG
 GATAAAGTTGCAAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTG
 ATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGA
 TGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGAT
 GAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTG
 CAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAA
 AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAG
 TTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATC
 CTTTTTTTCTGCGCATAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGT
 GGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTCCAAGGTAACCTGGCTTCAGCA
 GAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAA
 GAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCT
 GCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATA
 AGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTGCTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAAC
 GACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCC
 GAAGGGAGAAAGGCGGACAGGIATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCA
 CGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCA
 CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAA
 AACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGCTGGCCTT

Seq.9

ATTTAAATGAATACTTACAAGGTACTCCTGCACCCGGCACAAGCGTATGTAATTGCTA
 GCACGCCGGTGCCGACCCAACCTCCAACCTCCCGTGCTCACGCGCGCACACACGCACGC
 ACAAGCATCATCATCATCATCATGGTCATCCCTCCCTTATCTGGCGAAGGAGGCA
 CTGTGACGCAAGGTTTTCTGTGTCTCTCCTACCCCTCTACTGATTCTTCTTCTCTC

TTCTCTTCTCGCACTGCACCCCCCTCCCCCCCCCACACACACACTTGCTGTCAT
GGCTGTGCGCATTTCGCTCACTCTTGTGCGTGTCCTCGTTTCCCTCATGGCGTCGTGCTCT
TCCCTGCGCAACCAACCCACGCTGCACACGCACGCTCCACAGCGCGCTTCGCCTTCTT
CGCTCTCTCCCTAGCCTCCTCTCTGTACCCCTCCACTGCCGCCGCGGTTGGCCGCTCT
GCATCCTTTTCCCGCAGCCTTTCTTTTTTTTTTCACTGTCAGTCTGGCTCATACCCG
TGGAGCTGTGTCTCCCGAGCTTCCCATACACCCACCCCCACGACCTTTCTCAGCTT
CCTTTCTCAGTCGCTTGAGCACGCAGTGCATTCACTTCTTCGTCCCTCAGTTCGCCTC
GCTCTCGCTCTCTCTCGCGCGCGCTGCCGTACCCGCCCTCCTCGTACTCCCTCCTT
CCTCATCCCCACCCCCCGTGTGCGCCGGCTCCTCTCTGAATTCTAATACGACTCAC
TATAGGGAGATCGTCCCTATCAGTGATAGAGATCCAGTCGCAGCCTGACCGCATCACA
CATCAAGGCGTTACAGCCTCTCCGTCTTTGCTGCACCCAAGTGTATTCTGTGTACCGC
GTTGAGGGATCTAATGGATTTCGGAACCTTTGGTCTGTTTGTCTCTCATGCTGCCAATC
CCATGCGCTTTTCTCCGTGCCTCTCTGTCTCCCTTCCGTTCTATTTGGACAACGATG
TGTACTGTAATGCGTGCGCCATCTGACAACGAATAGATCAGCAGCATTTCGCACACTTG
CACATACCCAGTGAAGCTTTTGTGTCTGTGCTATTGACAACACCGACTGCAACAAGGT
GTAGATAGAAGTTGGCCTTCTCGCTCGCTCGCACGCTCTTCACGCTCCTGCTTTCCTT
GCTGTGCCTTGCCACCAGATCTGCCATGGCCATGCAGAGCTGGGGTACAATCATATGC
ATTGGAATTCTCTTGCGATTTCTTCTGCTCTGGGTGCTTATCGGGAACCTCACACACTG
AAGAAGACATCATAATTACAACCAAGAACGGAAAAGTCAGAGGGATGAACCTGCCAGT
TCTTGGTGGCACAGTAACAGCCTTTCTTGGGATTCCCTATGCACAGCCGCTCTTGGT
AGACTTCGATTCAAAAAGCCACAATCCTTGACTAAGTGGTCCAATATTTGGAATGCCA
CAAAATATGCCAATTCTTGCTATCAGAACACAGATCAAAGTTTCCAGGCTTCCTTGG
ATCAGAGATGTGGAACCCAAACACTGAACCTTAGTGAAGACTGTTTATATCTGAATGTG
TGGATTCCAGCACCTAAACCAAAAAATGCTACTGTAATGATATGGATCTATGGTGGTG
GTTTTCAAACCTGGGACATCATCTTTGCCTGTTTATGATGGCAAGTTTCTGGCTCGGGT
TGAAAGAGTTATTGTAGTTTCAATGAACATAGAGTGGGTGCCCTAGGATCTTAGCC
TTATCAGAAAATCCTGAGGCACCAGGGAACATGGGCTTATTTGATCAACAGTTGGCAC
TTCAGTGGGTCCAAAAAATATAGCAGCCTTTGGTGGTAATCCTAGAAGTGTAACCTCT
CTTTGGAGAAAGTGCAGGAGCAGCTTCAGTTAGCCTTCATTTACTTTCTCCTAGAAGC
CAGCCTTTGTTTACCAGAGCCATTCTGCAAAGTGGATCCTCTAATGCCCCCTGGGCAG
TAACATCTCTGTATGAAGCTAGGAACAGAACATTGACCCTAGCTAAACGTATGGGTTG
CTCTAGGGACAATGAGACTGAGATGATCAAATGTCTTCGAGACAAAGATCCCCAGGAA
ATTCTTCTGAATGAAGTATTTGTTGTCCCCTATGATACTCTCTTGTGAGTAACTTTG
GTCCAACCTGTGGATGGCGATTTTCTCACTGACATGCCAGATACACTACTCCAACCTTG
ACAGTTCAAAAGAACCAGATCTTGGTGGGTGTTAATAAAGATGAAGGGACAGCATTT
TTAGTATATGGGGCTCCTGGTTTCAGCAAAGATAACAACAGTATCATAACAAGAAAAG
AATTTTCAGGAGGGTTTAAAAATATTTTTTCCAAGAGTGAGTGAGTTTGGAAAGAGAATC
AATCCTTTTCCATTACATGGACTGGTTAGATGATCAGAGAGCCGAAAACCTACAGAGAG
GCCTTGGATGATGTTGTTGGGGATTACAATATCATATGCCCTGCCTTGGAGTTCACCA
AAAAGTTCTCAGAATTGGGAAATGATGCCTTTTTTCTACTATTTTGAACACCGATCGAC
CAAACCTTCTTGGCCAGAATGGATGGGAGTGATGCATGGTTACGAAATCGAATTTGTC
TTTGGTTTACCTCTGGAAAGAAGAGTTAATTACACAAAAGCTGAGGAAATTTTGAGTA
GATCCATTATGAAAACGCTGGGCAAATTTTGCAAATATGGAAATCCAAATGGGACCCA
GAGCAATAGCACAAAGATGGCCTGTCTTCAAGAGCACTGAACAAAAATATTTAACCTTG
AATACAGAGTCACCAAAAAGTGACACCAAACCTACGAGCTCAACAATGTGATTTCTGGA
CACTATTTTTTCTTAAAGTCTTGGAATTGACAGGAAATATTGATGAAGCAGAACGAGA
ATGGAAAGCAGGATTCCATCGCTGGAACAATTACATGATGGACTGGAAAAATCAATTT
AACGATTACACTAGCAAGAAAGAAAGCTGTTTCAAGATTTTCTTAAAGGTACCCACCACC
ATCACCACTAGGCGGCCGCCCTCCTCCTTTCTTGTTCCTTTCACGTCGCCTT
CTCGGTTGTAGCTGGCAGACGACGAGTCTTACTTTTACGTGTACTTCTCTATAGATGA
TGTATGATCTCTCTGCATGCGTGTTCCGTGCATGTGTCCGTGTGTTGTGTACGCGTGCG

TCTCGCCTCAGCTCCCGCGTGAAAGGGTTTGACTGCCCATGATGCGTGTGTATATCC
 ACGCGCAGGCACGCACACACACACACACACACACACACAGGCACACACAGGCACAC
 AAACGCATCTCAGGCCGAGCCGCATACGTCTCTCGCACGGTCTCGTTTATTTGATCAT
 GTAGTTGAGTATTAATTGGGAAGACAAAAACATAATAGCACGAAGAGTCGGGCACGA
 AAAGCCCCGATCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTCGCGCAGGGGCGTGTGGGTGCACGACGA
 CGAGGACGGAGGGGGGAAGGGAGGCATAAACGGATCGATCCCCCATCGCACATGCGGG
 TACGAGCATTATCTGCTGTGTCTGGTCCCTTTATCATATCGCTACCCGCCCGCCCCCG
 CCCCCCTCCCCCCCCCCCCCCCCCGCGGCTCCTGTCACTGTCTGTTTCTGCGACTCCCCA
 CACACCCGCGCAACGCTCATGTACGAAGAGAAAAAGTAGAAGGCGTGCGCATGCGTTG
 CGCGGCCCCCTGTCCGCTGGCATGCAGACGTCGAGCCGTGGAACGGATGGTAGCGAGA
 GACAACGCGGCGATGCAGGAAAGGAGATTTACTGCAGGACGTCTACACACGCGCGCAC
 ACCACTGCGAATGGCACCGTGCTGAGGAAAAATTGGGGGGGAGGGCGCACGGGGGCGGG
 GCAGGAAACGGTTGGATCAGCAGCACTCTCAACTTGTGTCCGTATTGCGAAGGAGGGGA
 GAGGAGCCTGCCGTAATTATGGGCGCTGAAACGTCGGAACCACCTATGAATCCCACTT
 CTGCGTCGCGGAGGCGTACTGCTTCCGACCACCTCCGCAGCTCACGCGCGTCGAGCTC
 CCTCCCTTTCCCTTCTTTCCGTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTTGTACGATG
 CATGGCCATCTCTCCTCCAACCCCTCCACGCCTTCTCTCCCCGCCCATCAAACGCGC
 TACGGCCACAACCATTTCTTCAAGTATCACATCCACCACCCTCTTACCCACCTACCC
 TCTTCGACTCTGACACAGCCACTGACGCCCTCTCCGCCTCTCTCGCTCGCTGCACATT
 GACTCTCCACAGCCCCCCCCCTCCCTCGCACAGCCAGCCCCACCCACCCACCCACCCACC
 CACCGCTCTACACACCTCCACAGCAGCCGGATCCACCGCATGGCCAAGTTGACCAGTG
 CCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGCGACGTCGCCGGAGCGGTGAGTTCTGGACCGACCG
 GCTCGGGTCTCCCGGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACAAC
 GTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACACCCTGGCCT
 GGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTCTGTGTCCAG
 GAACTTCCGGGACGCCTCCGGGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGG
 CGGGAGTTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCCTTCGTGGCCGAGGAGC
 AGGACGTCGAGTCCGGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAA
 GGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAG
 ATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGG
 TGACCAAGGGTGCGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCCTCAGTTCATGTA
 CGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCC
 TTCCCCGAGGGCTTCAAGTGAGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTG
 CCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCG
 CGGCACCAACTTCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACTATGGGCTGGGAG
 GCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGA
 GGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGC
 CAAGAAGCCCGTGACGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACC
 TCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACT
 CCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGACTAGTTCTAGTTCTAGGGGCCGAAT
 TAATTCAGATCCTCGTGTGAGCGTTTCGCGGAATCGGTGCGCTCGTGTATATGCCGTCT
 TGGTGTGTGTGCTCGCAAGGCGGTGCAGCAGGATACCGTCGCCCTCCTCTCTCCTTGCT
 TCTCTGTTCTTCAATTTCGCGATCTCACAGAGGCCGGCTGTGCACGCCCTTCTCTACCC
 TCCTTTTCCACCTCTCGGCCACCGGTTCGGCTCCGTTCCGTCTGCCGTGAGAAAGGGA
 CGGGCATGTGCAGCTCCTCCCTTTCTCTCGCGCGCGCATCTTCTCTTGCTTGTGGCAC
 TCACGCTCATGCGTCAAGGCGGCCCCACGCCGAGCCCCGCGCTCCCTTCCCTCTTG
 GCATCCGTAGCGCGGATGCCGTGATGCGCAAGGCCGGCATGAAGGAGCGCGTGCCCT
 CAAGAGGGCACACTATCATGCCCTACGTGGGCCACGCAGCGATGAGGCCGGCTTCGGC
 GGAGATGCGTCACGCACGTGCCAGATGATGCGCTACGCCTTCTTGACTTGCGCCCCC
 CTCTCTTCTCCGTCTCTCACTCTCTCTCTCTCACACACACACACACACACACACACA
 CACAAAGCTCCGGTTTCGTCCGGGCCCTGCAGGCATGCCGACGTTCCGTTGACCTGAACC

ACCTCGTCGCCGCTGTGATGTCTGGCGTGACCTGCTGCCTGCGCTTCCCTGGCCAGCT
GAACTCTGACCTGCGCAAGCTTCTCCTGCTCAACGACGGCGACGGCGCTGACGAGGTG
CAGAGTGGCACAGAAGCCGCGAGCGGCGTACAGCGACGAGGAGGGCGGGAAGTCGCCGA
GTGGTCCCCTGCGGAACGACTCCCTGTTTCATGTCCGCGTGGGACCGCCGTCGCAACCT
CACGAGCCGCCGCTGCGCATCACAACCATATTTCGGCCCCACCTGCGATTTCGATGGAC
TGCATTCTGAAGAAGCAGCCCTTCCCGGAGATGAAGCTCGGCGACTGGCTTCTAGTGC
CAGACATGGGCAGCTACACCACCGCTGCCGCGGGAGTCTTCAACGGTTTCGCGACACG
CCGCCTTGAGTTTGTGAGCTCTGTTGACTTGTCTGCGAGGTCGAGGGCTGTGCATGCG
CATGAGGGCAACACTTTTGTAGTTTCGTGAGCGAGTGAAAACGGGGCTGAGAGGATACAA
GGTGCTGTAGGATGAGATCCTCCGCCCACCAGAGCATGGGCTATCTCTTGTGTCTGTT
CTGAGCCTGCCTCTCTCTCTCTCTCTTGCCTCCCCCTCCCCCTCCCCACACACACCC
CACACGCACGCTCTGCGTCACCCTCTCCTCCCTCAGTAACGGGAGTAGACATGCAGAA
GAAGTATAACCTAATAACGTATGCGTTCCTGCAGGCATCCGAGATGGACACCAGAGCA
AGCGCGGGTGTGCGCGAGTGGCCAGGAAAGGGGAAGAGAGAGAAAGAGAGAGAGACGA
AGGAGCGCGTCCCGTCGTTGTGCGTCTTCTGTGGTGGCGCATTTAAATTTAGAGCTTG
ACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGC
GCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGC
TTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC
CCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA
CCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCC
GTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGA
AACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATC
GAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGTTTTTC
CAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGC
CGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTAC
TCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTG
CTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGG
ACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGAT
CGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGC
CTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGC
TTCCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACCTCTG
CGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG
GGTCTCGCGSTATCATTCGAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGT
TATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
ATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATAC
TTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTT
TGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGAC
CCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCATAATCTGCT
GCTTGCAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTCGCGGATCAAGAGCT
ACCAACTCTTTTTCCAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTT
TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATA
CCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTT
ACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGG
GGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTAT
CCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACG
CCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT
GTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTTA
CGGTTCCCTGGCCTTTTGTGTCGCTT

Seq.10

ATTTAAATGAATACTTACAAGGTACTCCTGCACCCGGCACAAGCGTATGTAATTGCTA
GCACGCCGGTGCCGACCCAACCTCCAACCTCCCGTGCTCACGCGCGCACACACGCACGC
ACAAGCATCATCATCATCATCATGGTCATCCCTCCCTTATCTGGCGAAGGAGGCA
CTGTGACGCAAGGTTTTCTGTGTCTCTCCTACCCCTCTACTGATTCCCTTCTTTCTCTC
TTCTCTTTCTCGCACTGCACCCCCCTCCCCCCCCCACACACACACACTTGCTGTCTAT
GGCTGTGCGCATTCGCTCCTCTTGCTGTGTCCCGTTTCCCTCATGGCGTGTGTGTCT
TCCCTGCGCAACCACCCACGCTGCACACGCACGCTCCACAGCGCGCTTCGCCTTCTT
CGCTCTCTCCCTAGCCTCCTCTGTGTACCCCTCCACTGCCGCCGCGGTTGGCCGCTCT
GCATCCTTTTCCCGCAGCCTTTCCTTTTTTTTTTCTACTGTCTAGTCTGGCTCATACCCG
TGGAGCTGTGTCTCCCGAGCTTCCCATACACCCACCCCCCACGACCTTCTCAGCTT
CCTTTCTCAGTCGCTTGAGCACGCAGTGCATTCACTTCTTCGTCCCTCAGTTCGCCTC
GCTCTCGCTCTCTCTCGCGCGCGCTGCCGTACCCGCCCTCCTCGTACTCCCTCCTT
CCTCATCCCCACCCCCCCCGTGTGCGCCGCTCCTCTCTGAATTCTAATACGACTCAC
TATAGGGAGATCGTCCCTATCAGTGATAGAGATCCAGTCGCAGCCTGACCGCATCACA
CATCAAGGCGTTACAGCCTCTCCGTCTTTGCTGCACCCAAGTGTATTCTGTGTGACCGC
GTTGAGGGATCTAATGGATTTCGGAACCTTTGGTCTGTTGGTCTCTCATGCTGCCAATC
CCATGCGCTTTTCTCCGTGCCCTCTCTGTCTCCCTTCCGTTCTATTTGGACAACGATG
TGTAATGTAATGCGTGCGCCATCTGACAACGAATAGATCAGCAGCATTCGCACACTTG
CACATACCCAGTGAAGCTTTTGTGTCTGTGCTATTGACAACACCGACTGCAACAAGGT
GTAGATAGAAGTTGGCCTTCTCGCTCGCTCGCACGCTCTTCACGCTCCTGCTTTCCCTT
GCTGTGCCCTTGCCACCAGATCTGCCATGGCCATGCAGTCCTGGGGTACCATCATCTGC
ATCCGTATCCTGCTGCGTTTCCCTGCTGCTGTGGGTCTGATCGGTAACCTCCACACCG
AAGAAGACATCATCATCACCACCAAAAACGGTAAAGTTCTGTTGATGAACCTGCCGGT
TCTGGGTGGTACCGTTACCGCTTTCCTGGGTATCCCGTACGCTCAGCCGCCGCTGGGT
CGTCTGCGTTTCAAAAACCGCAGTCCCTGACCAATGGTCCAACATCTGGAACGCTA
CCAAATACGCTAACTCCTGCTACCAGAACACCGACCGAGTCCTTCCCGGGTTTCCTGGG
TTCCGAAATGTGGAACCCGAACACCGAACTGTCCGAAGACTGCCTGTACCTGAACGTT
TGGATCCCGGCTCCGAAACCGAAAAACGCTACCGTTATGATCTGGATCTACGGTGGTG
GTTTCCAGACCGGTACCTCCTCCCTGCCGGTTTACGACGGTAAATTCTGGCTCGTGT
TGAACGTGTTATCGTTGTTTCCATGAACTACCGTGTTGGTGCTCTGGGTTCCTGGCT
CTGTCCGAAAACCCGGAAGCTCCGGGTAAACATGGGTCTGTTCCGACCAGCAGCTGGCTC
TGCAGTGGGTTCAGAAAAACATCGCTGCTTTCGGTGGTAACCCGCGTTCCGTTACCTT
GTTCCGGTGAATCCGCTGGTGCTGCTTCCGTTTCCCTGCACCTGCTGTCCCGCGTTCC
CAGCCGCTGTTTACCCGTGCTATCCTGCAGTCCGGTTCCTCCAACGCTCCGTGGGCTG
TTACCTCCCTGTACGAAGCTCGTAACCGTACCCTGACCTGGCTAAACGTATGGGTG
CTCCCGTGACAACGAACCGAAATGATCAAATGCCTGCGTGACAAAGACCCGCAGGAA
ATCCTGCTGAACGAAGTTTTCTGTTGTTCCGTACGACACCCTGCTGTCCGTAACTTCG
GTCCGACCGTTGACGGTGACTTCCTGACCGACATGCCGGACACCCTGCTGCAGCTGGG
TCAGTTCAAACGTACCCAGATCCTGGTTGGTGTAAACAAAGACGAAGGTACCGCTTTC
CTGGTTTACGGTGCTCCGGGTTTCTCCAAAGACAACAACTCCATCATCACCCTGAAAG
AATTCAGGAAGGTCTGAAAATCTTCTTCCCGCGTGTTCGGAATTCGGTCTGTAATC
CATCCTGTTCCACTACATGGACTGGCTGGACGACGAGCGTGCTGAAAACCTACCGTGAA
GCTCTGGACGACGTTGTTGGTGACTACAACATCATCTGCCCGGCTCTGGAATTCACCA
AAAAATTCTCCGAACTGGGTAAACGACGCTTCTTCTACTACTTCGAACACCGTTCCAC
CAAACCTGCCGTGGCCGGAATGGATGGGTGTTATGCACGGTTACGAAATCGAATTCGTT
TTCGGTCTGCCGCTGGAACGTCGTGTTAACTACACCAAAGCTGAAGAAATCCTGTCCC
GTTCCATCATGAAACGTTGGGCTAACTTCGCTAAATACGGTAACCCGAACGGTACCCA
GTCCAACCTCCACCCGTTGGCCGGTTTTCAAATCCACCGAACAGAAATACCTGACCCCTG
AACACCGAATCCCGAAAGTTTACACCAAACCTGCGTGCTCAGCAGTCCGTTTCTGGA
CCCTGTTCTTCCCGAAAGTTCTGGAACCTGACCGGTAAACATCGACGAAGCTGAACGTGA

ATGGAAAGCTGGTTTCCACCGTTGGAACAACACTACATGATGGACTGGAAAAACCAGTTC
AACGACTACACCTCCAAAAAAGAATCCTGCTCCGACTTCCTTAAGGGTACCCACCACC
ATCACCACCACCTAGGCGGCCGCCCTCCTCCTCCTTTCTTGTTCCCTTTCACGTGCGCCTT
CTCGGTTGTAGCTGGCAGACGACGAGTCTTACTTTTACGTGTACTTCTCTATAGATGA
TGTATGATCTCTCTGCATGCGTGTTTCGTGCATGTGTCCGTGTGTGTGTGTACGCGTGCG
TCTCGCCTCAGCTCTCCGCGTGAAAGGGTTTGACTGCCCATGATGCGTGTGTATATCC
ACGCGCAGGCACGCACACACACACACACACACACAGGCACACACAGGCACAC
AAACGCATCTCAGGCCGAGCCGCATACGTCTCTCGCACGGTCTCGTTTATTTGATCAT
GTAGTTGAGTATTAAATGGGAAGACAAAAACATAATAGCACGAAGAGTCGGGCACGA
AAAGCCCGATCTCTCTCTCTCTCTCTCGTGCGCGCAGGGGCGTGTGGGTGCACGACGA
CGAGGACGGAGGGGGGAAGGGAGGCATAAACGGATCGATCCCCCATCGCACATGCGGG
TACGAGCATIATCTGCTGTGTCTGGTCCTTTATCATATCGCTACCCGCCCGCCCCCG
CCCCCTCCCCCCCCCCCCCCCCCGCGGCTCCTGTCACTGTCTGTTTCTGCGACTCCCCA
CACACCCGCGCAACGCTCATGTACGAAGAGAAAAGTAGAAGGCGTGGCGATGCGTTG
CGCGGCCCCCTGTCCGCTGGCATGCAGACGTGAGCCGTGGAACGGATGGTAGCGAGA
GACAACGCGGCGATGCAGGAAAGGAGATTTACTGCAGGACGTCTACACACGCGCGCAC
ACCACTGCGAATGGCACCGTGCTGAGGAAAATTGGGGGGGAGGGCGCACGGGGGCGGG
GCAGGAAACGGTTGGATCAGCAGCACTCTCAACTTGTGTCCGTATTGCGAAGGAGGGA
GAGGAGCCTGCCGTATTATGGGCGCTGAAACGTCGGAACCACCTATGAATCCCACCTT
CTGCGTCGCGGAGGCGTACTGCTTCCGACCACCTCCGCAGCTCACGCGCGTCGAGCTC
CCTCCCTTTCCCTTCTTTCCGTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTTGTACGATG
CATGGCCATCTCTCCTCCAACCCTCCACGCCTTCCTCTCCCCCGCCCATCAAACGCGC
TACGGCCACAACCATTCTTTCAAGTATCACATCCACCACCACCTCTTACCCACCTACCC
TCTTCGACTCTGACACAGCCACTGACGCCCTCTCCGCCTCTCTCGCTCGCTGCACATT
GACTCTCCACAGCCCCCTCCCTCGCACAGCCAGCCCCACCCACCCACCCACCCACC
CACCGCTCTACACACCTCCACAGCAGCCGGATCCACCGCATGGCCAAGTTGACCAGTG
CCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGCGACGTGCGCCGAGCGGTGAGTTCTGGACCGACCG
GCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACAAC
GTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGACAACACCCTGGCCT
GGGTGTGGGTGCGCGGCCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTGCTGTCCAC
GAACTTCCGGGACGCCTCCGGGCCGCGCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGG
CGGGAGTTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCACCTTCGTGGCCGAGGAGC
AGGACGTGAGTCCGGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAA
GGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAG
ATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGG
TGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCCTGGGACATCCTGTCCCTCAGTTCATGTA
CGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCC
TTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCCTGGTGA
CCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCG
CGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACTATGGGCTGGGAG
GCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGA
GGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGC
CAAGAAGCCCGTGACGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACC
TCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACT
CCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAGACTAGTTCTAGTTCTAGGGGCCGAAT
TAATTCAGATCCTCGTGTGAGCGTTTCGCGGAATCGGTGCTCGTGTCTTATGCCCGTCT
TGGTGTGTGTGCTCGCAAGGCGGTGCAGCAGGATACCGTCGCCCTCCTCTCTCCTTGCT
TCTCTGTTCTTCAATTTCGCGATCTCACAGAGGCGCGCTGTGCACGCCCTTCCTCACCC
TCCTTTTCCCACCTCTCGGCCACCGGTGCGCTCCGTTCCGTCTGCCGTGAGAAGGGA
CGGGCATGTGCAGCTCCTCCCTTCTCTCGCGCGCGCATCTTCTCTTGCTTGTGGCAC
TCACGCTCATGCGTCAAGGCGGGCCCCACGCCGAGCCCCCTGCGCTCCCTTCCCTCTTGC

GCATCCGTAGCGCGGATGCCGTGATGCGCAAGGCCGGCATGAAGGAGCGCGTGCCCT
CAAGAGGGGCACACTATCATGCCCTACGTGGGCCACGCAGCGATGAGGCCGGCTTCGGC
GGAGATGCGTCACGCACGTGCCAGATGATGCGCTACGCCTTCCTTGACTTGCGCCCCC
CTCTCTTCCCTCCGTCTCTCACTCTCTCTCTCTCACACACACACACACACACACACA
CACAAAGCTCCGGTTCGTCCGGGCCCTGCAGGCATGCCGACGTTCCGGTGACCTGAACC
ACCTCGTCGCGCGTGTGATGTCTGGCGTGACCTGCTGCCTGCGCTTCCCTGGCCAGCT
GAACTCTGACCTGCGCAAGCTTCTCCTGCTCAACGACGGCGACGGCGCTGACGAGGTG
CAGAGTGGCACAGAAGCCGCAGCGGCGTACAGCGACGAGGAGGGCGGGAAGTCGCCGA
GTGGTCCCCCTGGCGAACGACTCCCTGTTTATGTCCGCGTGGGACCGCCGTCGCAACCT
CACGAGCCGCCCGCTGCGCATCACAACCATATTCGGCCCCACCTGCGATTCGATGGAC
TGCATTCTGAAGAAGCAGCCCTTCCCGGAGATGAAGCTCGGCGACTGGCTTCTAGTGC
CAGACATGGGCAGCTACACCACCGCTGCCGCGGGAGTCTTCAACGGTTTCGCGACACG
CCGCTTGTAGTTTGTGAGCTCTGTTGACTTGTCTGCGAGGTGAGGGCTGTGCATGCG
CATGAGGGCAACACTTTTGTAGTTTCGTGAGCGAGTGAACCGGGCTGAGAGGATACAA
GGTGTGTAGGATGAGATCCTCCGCCCCACAGAGCATGGGCTATCTCTTGTGTCTGTT
CTGAGCCTGCCTCTCTCTCTCTCTTGCCTCCCCCTCCCCCTCCCCACACACACCC
CACACGCACGCTCTGCGTCACCTCTCCTCCCTCAGTAACGGGAGTAGACATGCAGAA
GAAGTATACCACTAATACGTATGCGTTCTTGCAGGCATCCGAGATGGACACCAGAGCA
AGCGCGGGTGTGCGCGAGTGGCCAGGAAAGGGGAAGAGAGAGAAAGAGAGAGAGACGA
AGGAGCGCGTCCCGTCGTTGTGCGTCTTCTGTGGTGGCGCATTTAAATTTAGAGCTTG
ACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGC
GCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGC
TTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC
CCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA
CCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATCAACATTTCC
GTGTGCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGA
AACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATC
GAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTC
CAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGC
CGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTAC
TCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTG
CTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGG
ACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGAT
CGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGC
CTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGC
TTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTG
CGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG
GGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGT
TATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG
ATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACCTGTGAGACCAAGTTTACTCATATATAC
TTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTT
TGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGAC
CCCGTAGAAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCATAATCTGCT
GCTTGCAAACAAAAAACCCAGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCT
ACCAACTCTTTTTCCAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTT
TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATA
CCTCGCTCTGCTAATCCGTGTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTT
ACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGG
GGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCT
ACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTAT
CCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACG

CCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT
GTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAACACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTTA
CGGTTCTTGGCCTTTTGCTGGCCTT

Zastrzeżenia patentowe

1. Wektor DNA zdolny do transformacji i integracji z chromosomem *Leishmania tarentolae*, zawierający gen kodujący skróconą wersję butyrylocholinoesterazy BChE pokazany na Seq. 3 lub Seq. 7 lub Seq. 8, pozbawiony domeny tetrameryzacyjnej, kierujący biosyntezą rekombinantowego białka z zawartej w genie Otwartej Ramie Odczytu, przy czym gen zawierający Otwartą Ramę Odczytu koduje białko o Seq. 1 zawierające sumarycznie 564 reszt aminokwasowych i opatrzone na N-końcu sekwencją sekrecyjną *Leishmania* o 23 resztach aminokwasowych oraz zawierające dodatkowo 2 reszty aminokwasowe Gly-Ala, a na C-końcu 4 reszty aminokwasowe Leu-Lys-Gly-Thr oraz znacznik 6-ciu reszt His.
2. Wektor DNA zdolny do transformacji i integracji z chromosomem *Leishmania tarentolae*, do produkcji białka o Seq. 4, zawierającego sumarycznie 614 reszt aminokwasowych, w tym dodatkowe 2 reszty aminokwasowe Met-Ala na N-końcu, a na C-końcu opatrzoną dodatkowymi 4 resztami aminokwasowymi Leu-Lys-Gly-Thr oraz znacznikiem 6-ciu reszt His, przy czym wektor zawiera gen kodujący holoenzym końskiej butyrylocholinoesterazy BChE o sekwencji Seq. 6.
3. Wektor DNA, zdolny do transformacji i integracji z chromosomem *Leishmania tarentolae* do produkcji białka o Seq. 4 zawierającego sumarycznie 614 reszt aminokwasowych, w tym dodatkowe 2 reszty aminokwasowe Met-Ala na N-końcu, a na C-końcu opatrzone dodatkowymi 4 resztami aminokwasowymi Leu-Lys-Gly-Thr oraz znacznikiem 6-ciu reszt His, przy czym wektor zawiera gen syntetyczny kodujący holoenzym końskiej butyrylocholinoesterazy BChE o Seq. 3.
4. Wektor DNA według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jest wektorem wahadłowym klonowania i ekspresji białek, zawierającym dodatkowo minimum dwa origin replikacji, korzystnie dla *Escherichia coli* i/lub *Leishmania tarentolae*.
5. Wektor DNA według zastrz. 1 lub 2, **znamienny tym**, że koduje sygnał sekrecyjny, korzystnie pochodzący z *Leishmania*, geny oporności na antybiotyki, korzystnie bleomycynę i/lub ampicylinę, promotor transkrypcji, korzystnie bakteriofaga T7, gen represora transkrypcji, korzystnie regulowany przez tetracyklinę, gen operatora, korzystnie regulowany przez represor tetracyklinowy, sygnał inicjacji translacji, sekwencję kodującą sygnał stopu translacji, korzystnie sekwencję kodującą 6-ciu reszt histydyny.

Rysunki

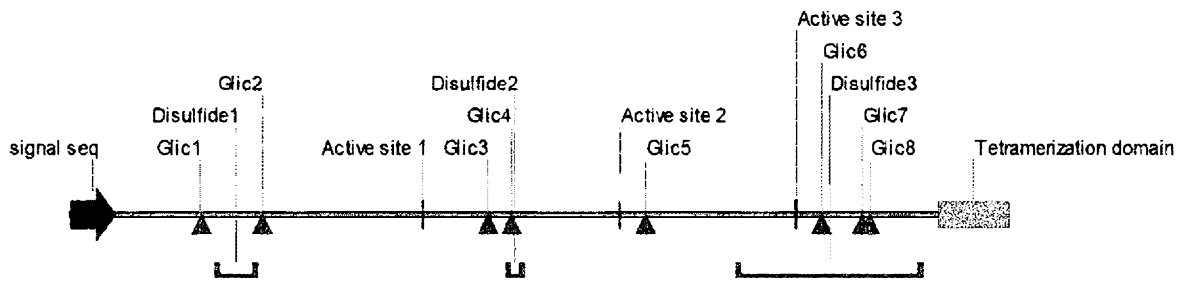


Fig. 1

	SP-BChE-His		SPCS	GA-BChE-His	
	↓		↓ ↗		
	signal peptide				
1	MASRLVRVLA	AAMLVAAAVS	VDAGAEEDII	ITTKNGKVRG	MNLPVLGGTV
51	TAFLGIPYAQ	PPLGRLRFKK	PQSLTKWSNI	WNATKYANSC	YQNTDQSFPG
101	FLGSEMWNPN	TESEDCLYL	NWIPAPKPK	NATVMIWIYG	GGFQTGTSSL
151	PVYDGKFLAR	VERVIVVSMN	YRVGALGFLA	LSENPEAPGN	MGLFDQQLAL
201	QWVQKNIAAF	GGNPRSVTLF	GESAGAASVS	LHLLSPRSQP	LFTRAILQSG
251	SSNAPWAVTS	LYEARNRTL	LAKRMGCSR	NETEMIKCLR	DKDPQEILLN
301	EVFVVPYDTL	LSVNFPGTVD	GDFLTDMPDT	LLQLGQFKRT	QILVGVNKDE
351	GTAFLVYGAP	GFSKDNNSII	TRKEFQEGLK	IFFPRVSEFG	RESILFHYMD
401	WLDDQRAENY	REALDDVVD	YNIICPALEF	TKKFSELGND	AFFYYFEHRS
451	TKLPWPEWMG	VMHGYEIEFV	FGLPLERRVN	YTKAEIILSR	SIMKRWANFA
501	KYGNPNGTQS	NSTRWPVFKS	TEQKYLTLNT	ESPKVYTKLR	AQQCRFWTLF
551	FPKVLKGTHH	HHHH			

Fig. 2

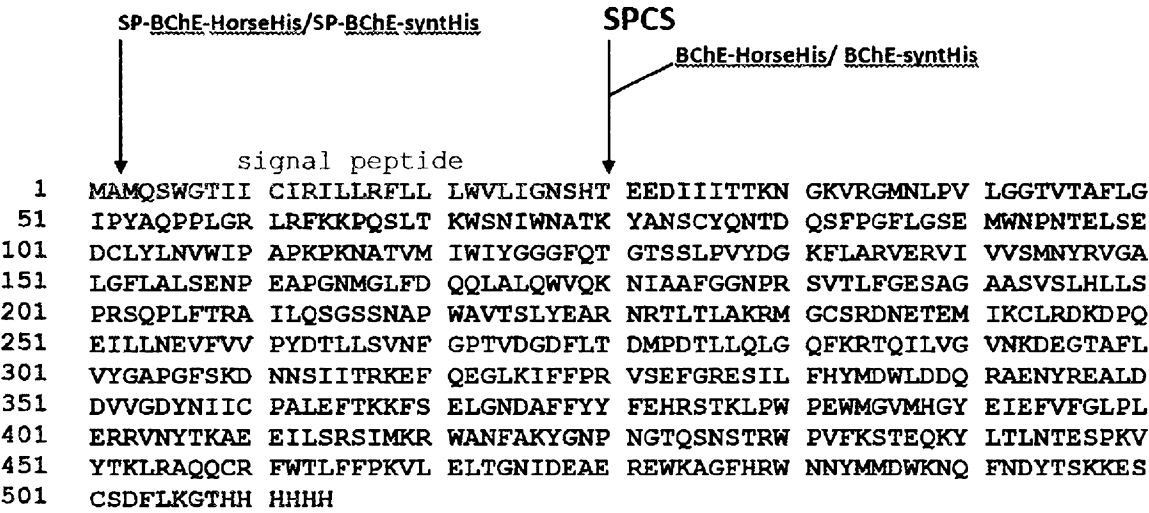


Fig. 3

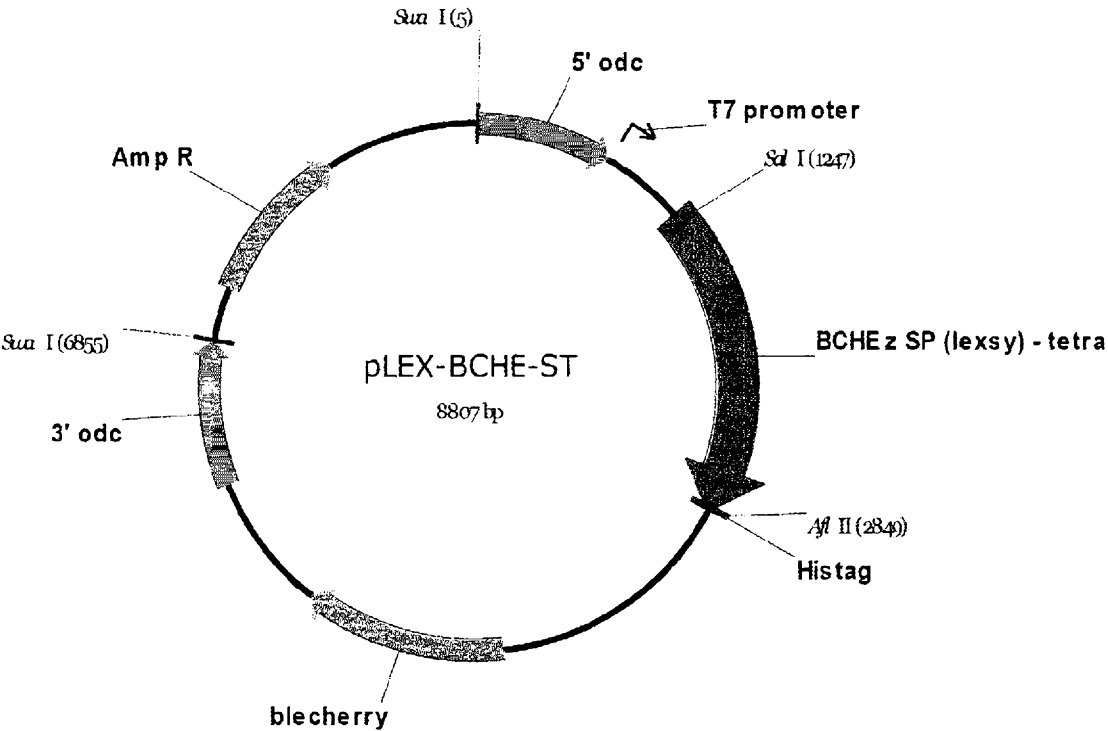


Fig. 4

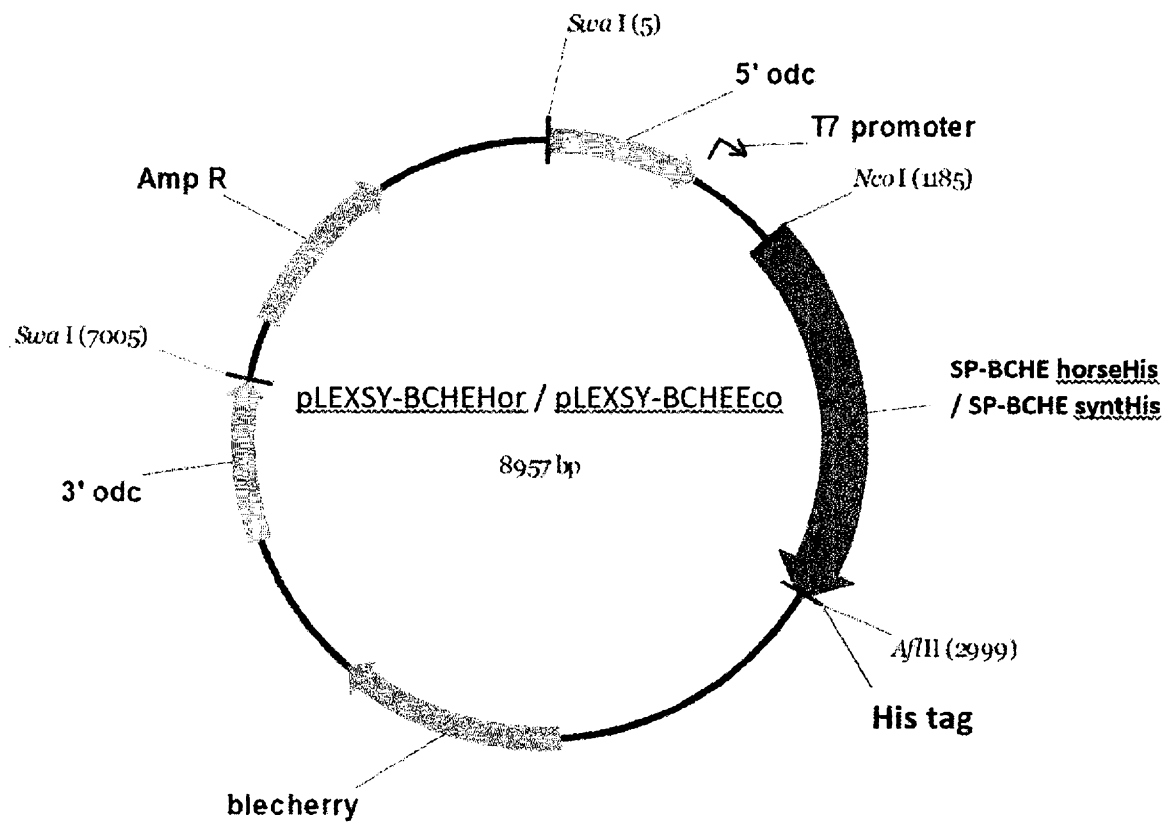


Fig. 5

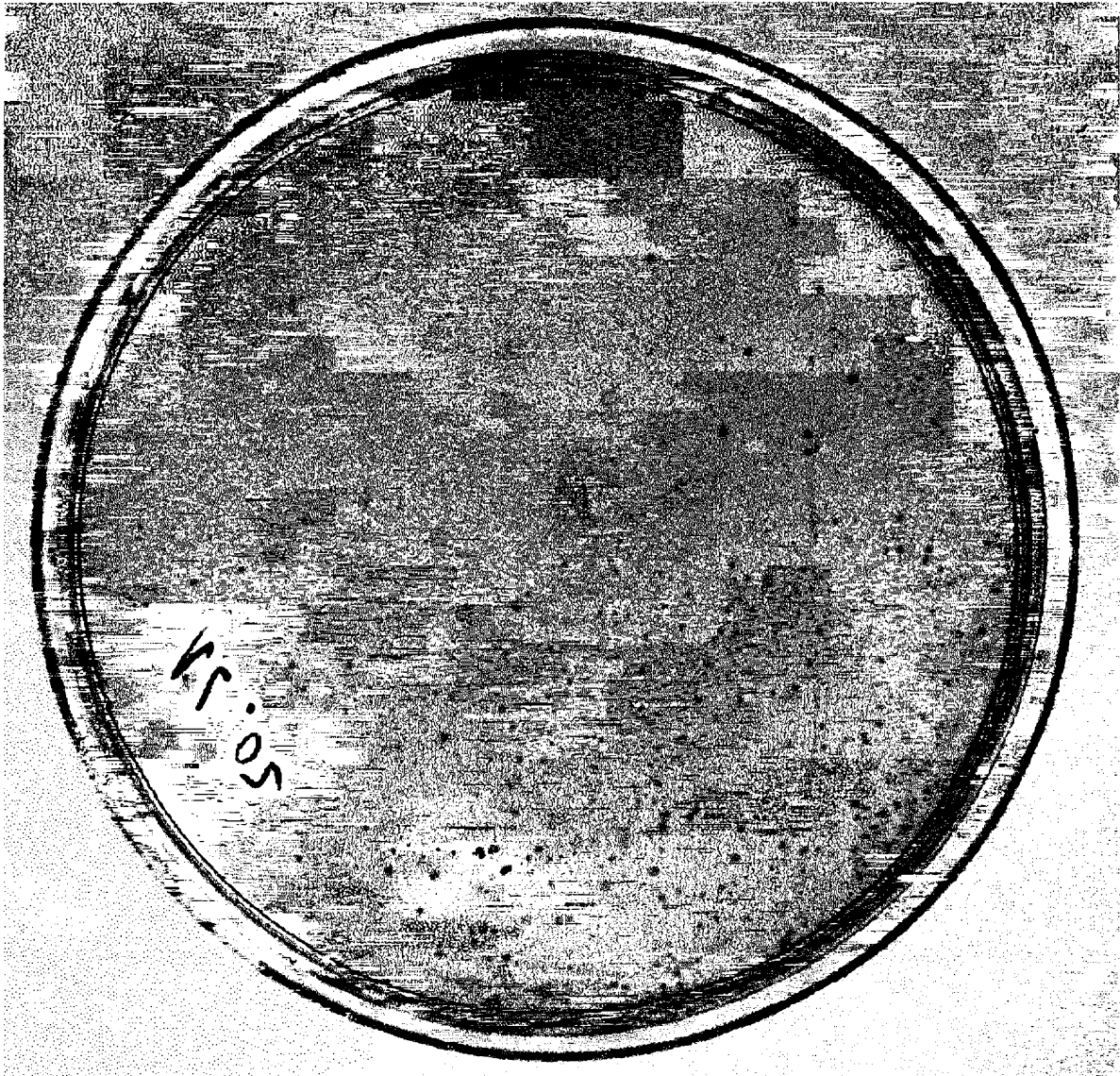


Fig. 6



Fig. 7

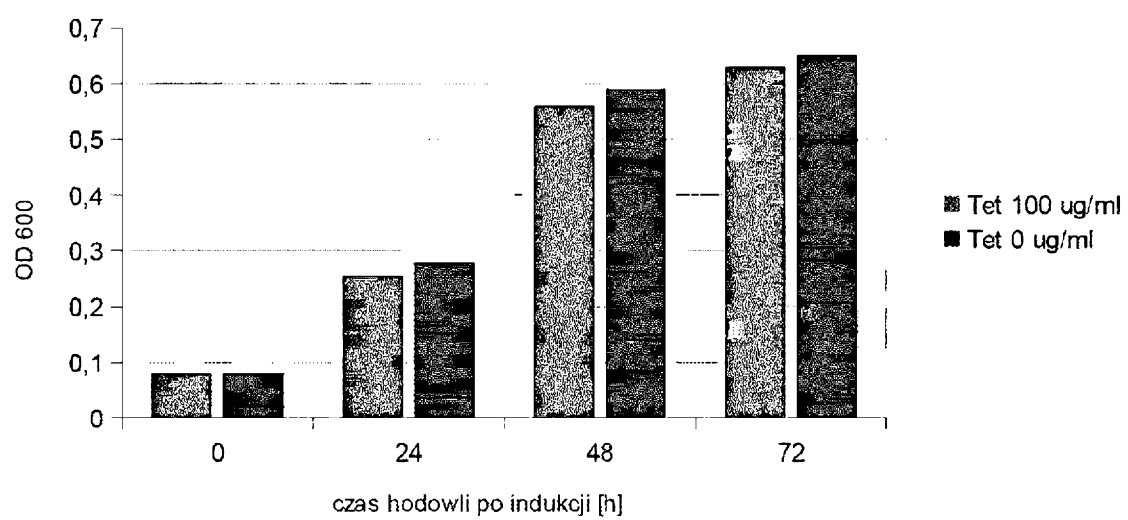


Fig. 8

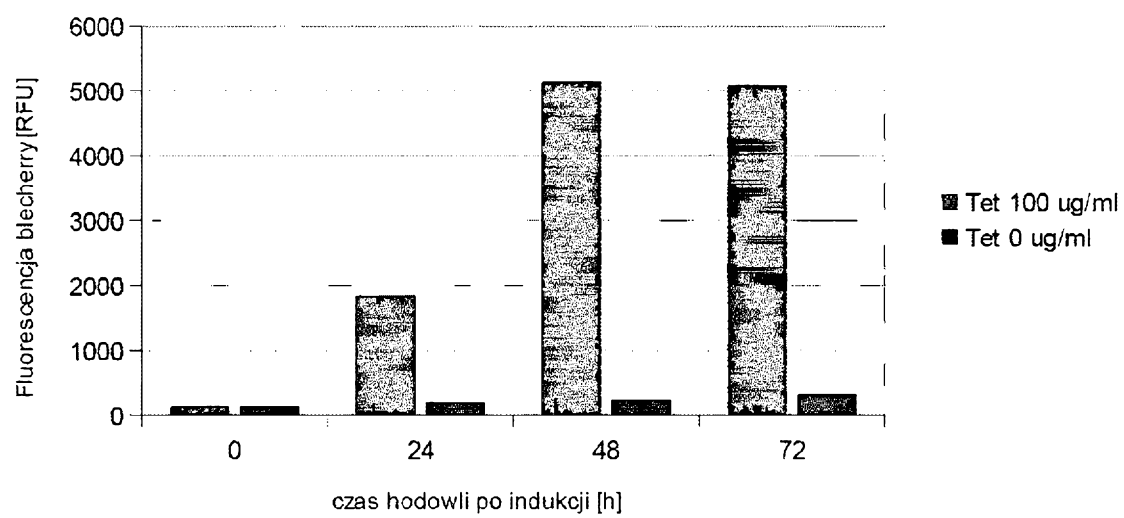


Fig. 9

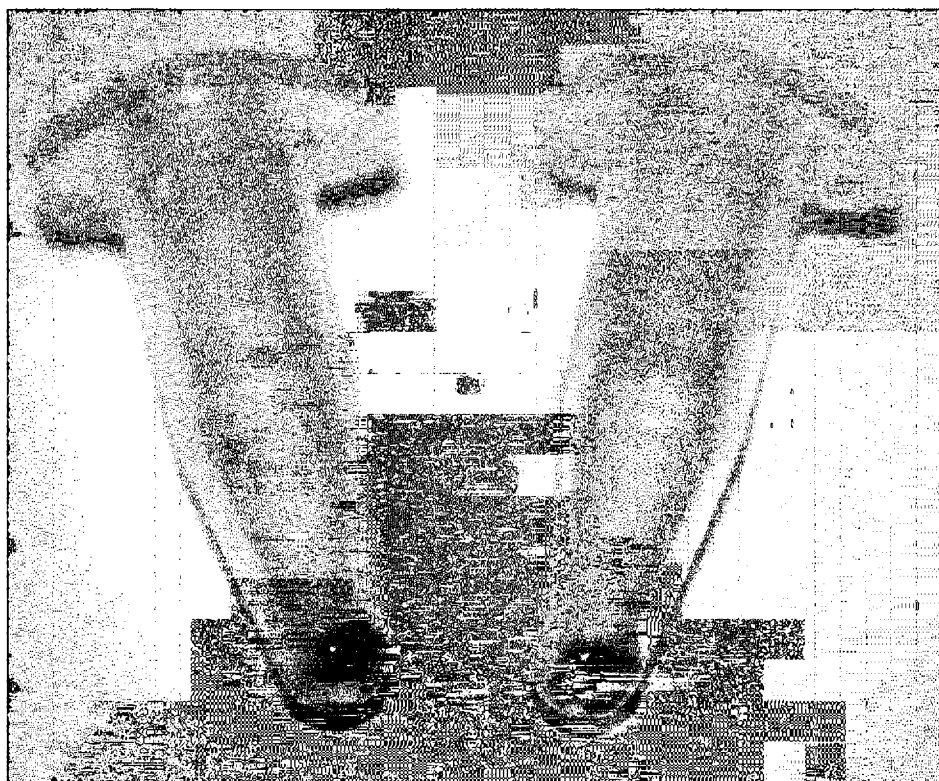


Fig. 10

M 1 2 3 4 5

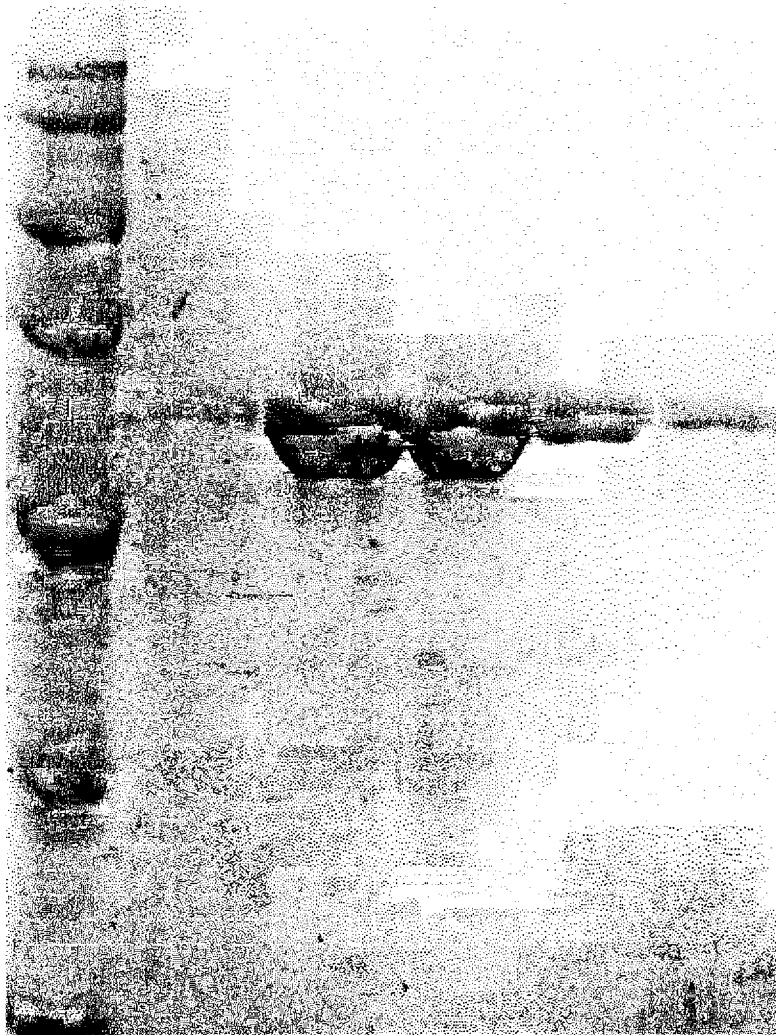


Fig. 11

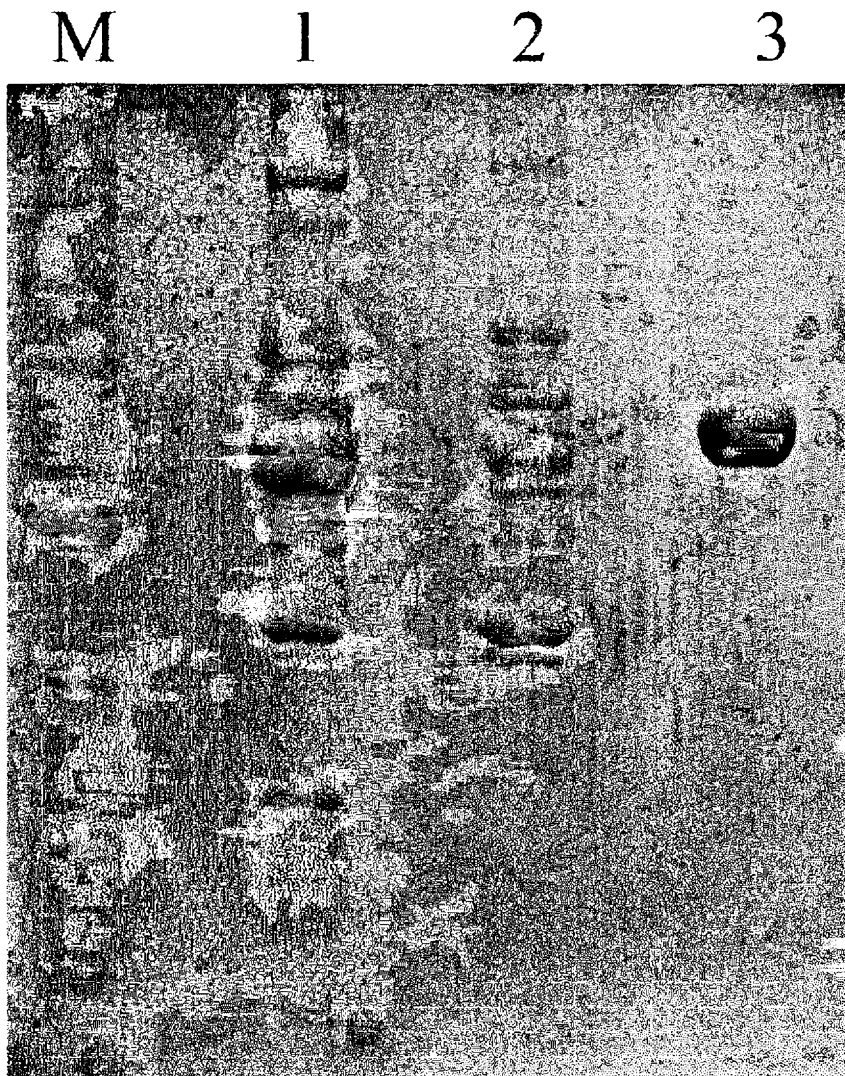


Fig. 12

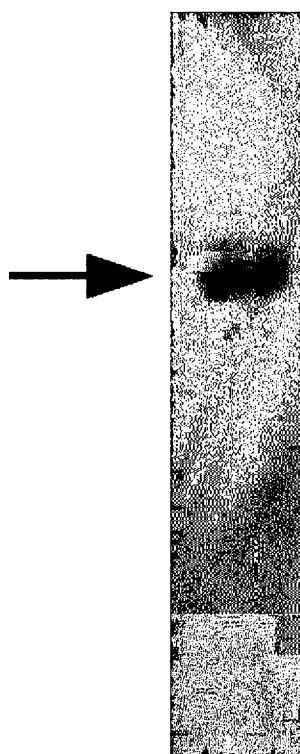


Fig. 13

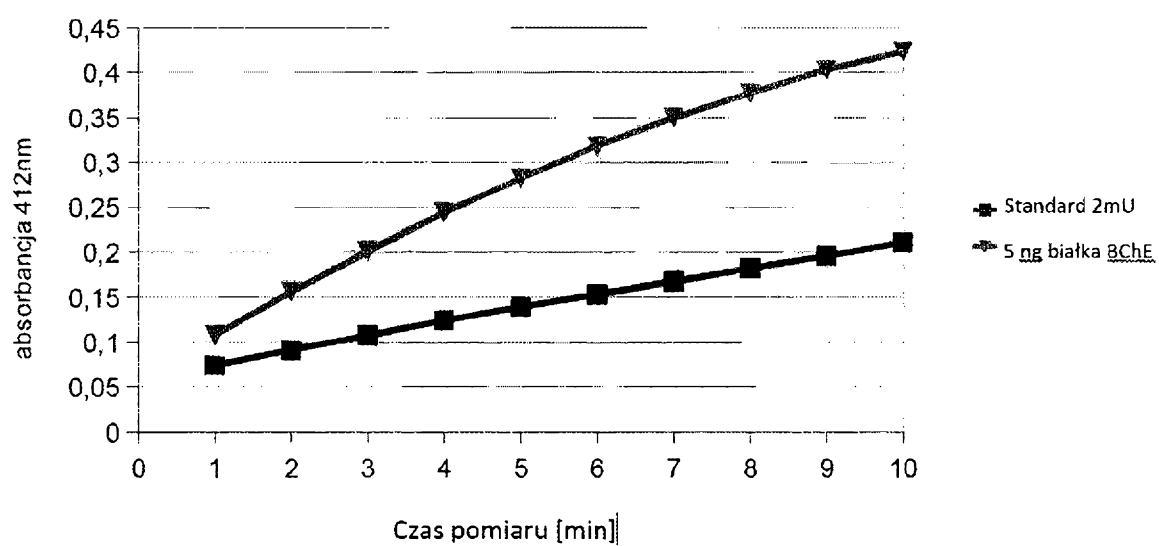


Fig. 14

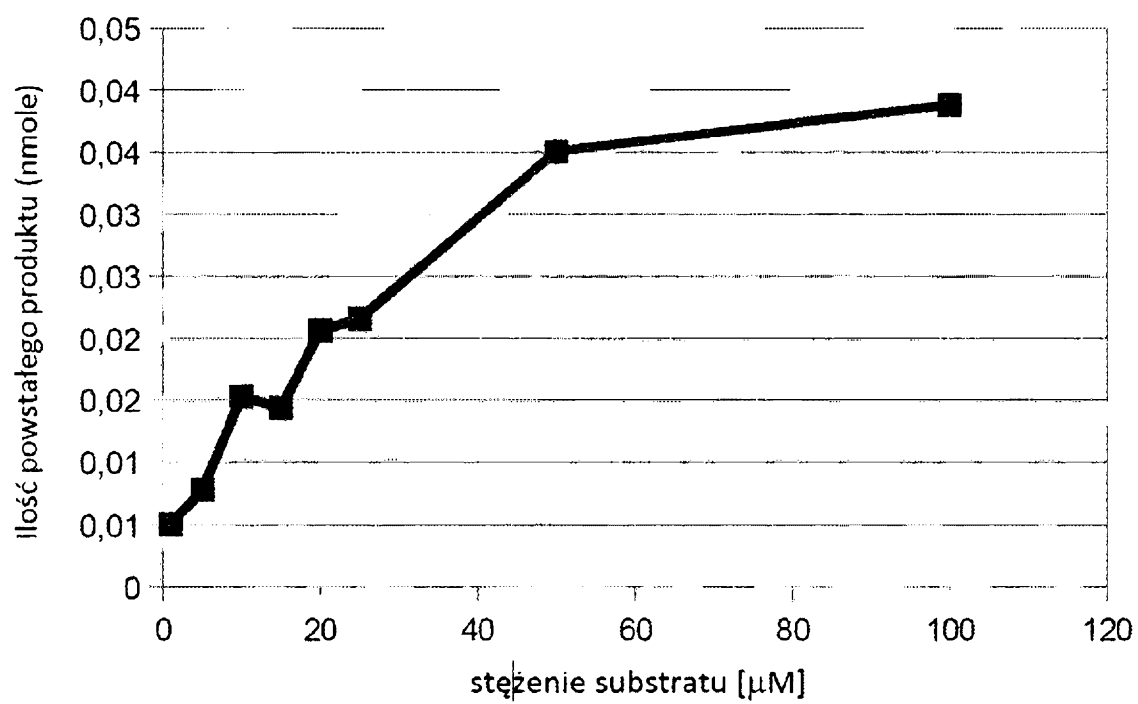


Fig. 15

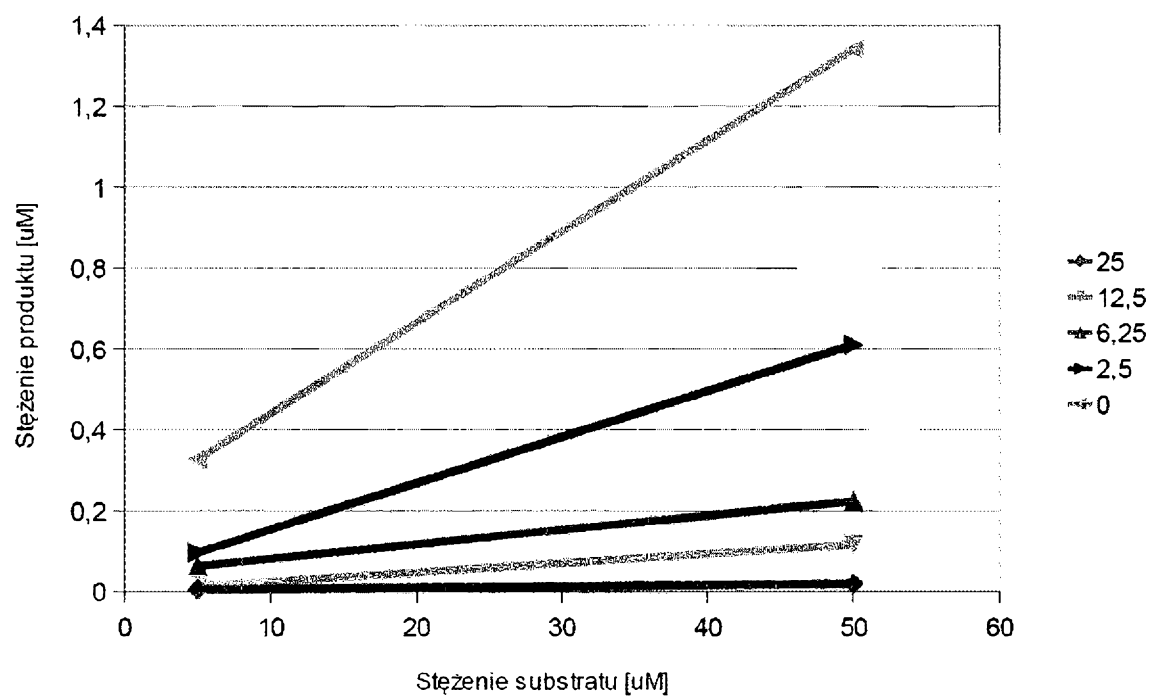


Fig. 16

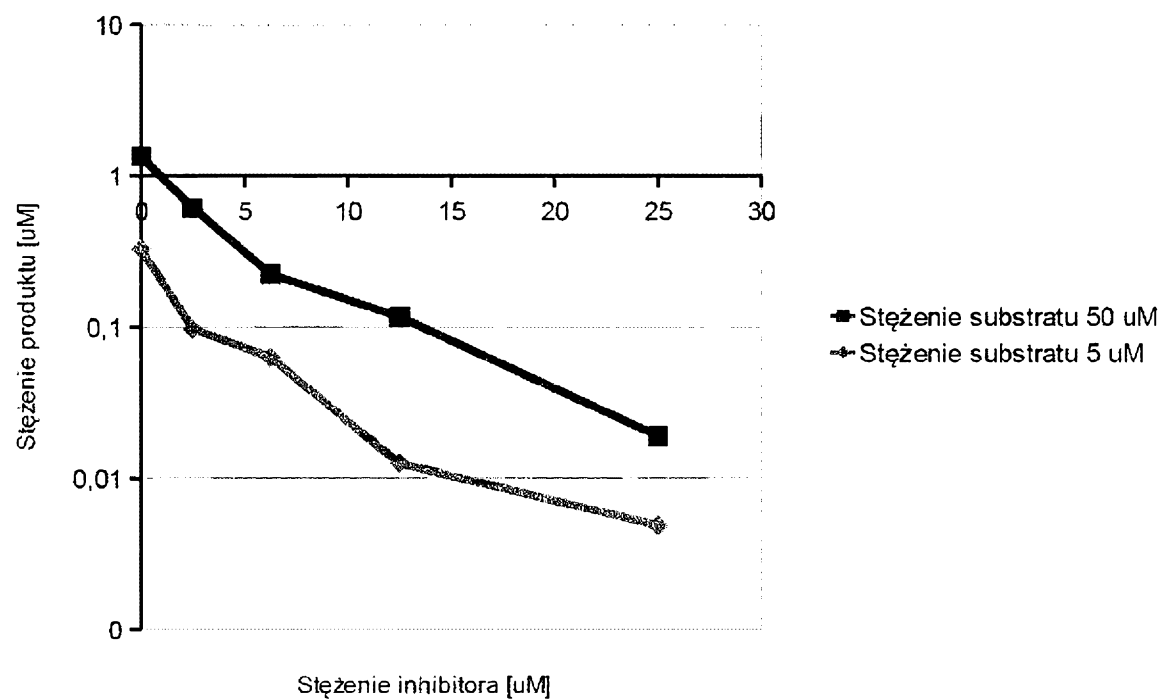


Fig. 17