

ÖZET

TAL EFEKTÖRÜ ARACILI DNA MODİFİKASYONU

Mevcut buluş gen hedeflemesi için yöntemlerle, özellikle de transkripsiyon aktivatör benzeri (TAL) efektör dizilerinin kullanımını içeren yöntemlerle ilgilidir.

İSTEMLER

1. Promotör bir diziye işlevsel olarak bağlı bir nükleazı kodlayan bir nükleotid dizisine bağlı olan diziye özgü bir TAL efektörünü kodlayan bir nükleotid dizisini içeren, diziye özgü bir endonükleazı kodlayan bir rekombinant nükleik asit ekspresyon vektörü **olup, özelliği**; burada vektörün bir plazmid olmasıdır.
2. İstem 1'e göre bir rekombinant nükleik asit ekspresyon vektörü **olup, özelliği**; burada söz konusu nükleazın bir tip II kısıtlama endonükleazı olmasıdır.
3. İstem 2'ye göre bir rekombinant nükleik asit ekspresyon vektörü **olup, özelliği**; burada bahsi geçen nükleazın *FokI* olmasıdır.
4. İstem 1'e göre bir rekombinant nükleik asit ekspresyon vektörü **olup, özelliği**; burada bir diziye özgü TAL-efektörünü kodlayan söz konusu nükleotid dizisinin, 12 ve 13. pozisyonlarda, spesifik DNA dizilerini tanıyabilen ve bunlara bağlanabilen yüksek oranda değişken kalıntılarla bir dizi ardışık tekrarı kodlamasıdır.
5. İstem 3'e göre bir rekombinant nükleik asit ekspresyon vektörü **olup, özelliği**; burada söz konusu tekrarların AvrBs3'ün merkezi bölgesinden seçilen ve SEQ. ID. NO:3'de belirtilen bir amino asit dizisine sahip olan 34 amino asit tekrarı olmasıdır.
6. İstemler 1 ila 4'ten herhangi birine göre bir rekombinant nükleik asit ekspresyon vektörü **olup, özelliği**; burada bir diziye özgü TAL-efektörünü kodlayan söz konusu nükleotid dizisinin, uygun tekrarların karakteristik nihai yarı tekrarı

haricinde merkezi tekrar bölgesinden yoksun bir tal geninin kesik bir formunu içeren Gateway-hazır yüksek kopya bakteriyel klonlama vektörüne sırayla eklenmesi ile birleştiriliyor olmasıdır.

7. Diziye özgü bir endonükleaz mesajcı RNA (mRNA) veya proteini üretmek için bir yöntem **olup, özelliği**; istemler 1 ila 6'dan herhangi birine göre bir rekombinant nükleik asidin kopyalanması veya kopyalanması ve dönüştürülmesi adımını içeriyor olmasıdır.
8. İstem 7'ye göre olan yöntem ile elde edilebilen, diziye özgü bir endonükleaz mRNA **olup, özelliği**; burada rekombinant nükleik asit tarafından kodlanan nükleazın FokI olmasıdır.
9. Terapötik bir bileşim **olup, özelliği**; istemler 1 ila 6'dan herhangi birine göre olan rekombinant bir nükleik asidi veya istem 7'deki yöntem ile üretilen bir mRNA'yı içermesidir.
10. İstem 9'a göre terapötik bir bileşim **olup, özelliği**; viral hastalıkların tedavisinde kullanım için olmasıdır.
11. Bir hücredeki hedeflenmiş genetik rekombinasyon için
 - (a) izole edilmiş bir hücreye, seçilen bir DNA hedef dizisine hedeflenen bir TAL efektör endonükleazını kodlayan, istemler 1 ila 6'ya göre olan bir nükleik asidin veya istem 8'e göre bir mRNA'nın eklenmesi;
 - (b) hücre içinde TAL efektör endonükleaz ekspresyonunun indüklenmesi;
 - (c) seçilen DNA hedef dizisinin bir mutasyon sergilediği bir hücrenin tanımlanması adımlarını

içeren bir yöntem **olup, özelliği**; buradaki yöntemin, insan germ hattı genetik kimliğini değiştirmek için bir yöntem olmamasıdır.

12. İstem 11'e göre bir yöntem **olup, özelliği**; burada, c) adımındaki söz konusu mutasyonun, genetik materyalin silinmesi, genetik materyalin eklenmesi veya her ikisinden oluşan gruptan seçiliyor olmasıdır.

13. İstem 11 veya 12'ye göre bir yöntem **olup, özelliği**; burada söz konusu hücrenin bir böcek, bitki, balık veya memeli hücresi olmasıdır.

TARİFNAME

TAL EFEKTÖRÜ ARACILI DNA MODİFİKASYONU

TEKNİK ALAN

- 5 Mevcut buluş gen hedeflemesi için yöntemlerle, özellikle de transkripsiyon aktivatör benzeri (TAL) efektör dizilerinin kullanımını içeren yöntemlerle ilgilidir.

ÖNCEKİ TEKNİK

- Homolog rekombinasyon (gen hedeflemesi) yoluyla kromozomları
10 modifiye etme kabiliyeti biyologların uzun zamandır hedeflediği bir şey olmuştur. Örneğin bitkilerde gen hedeflemesi bitki genlerinin fonksiyonunun ayırt edilmesine yardımcı olabilir ve bu mahsul iyileştirmesi için yeni imkanları meydana getirecektir. Örneğin, gen hedeflemesi ile, değiştirilmiş yağ
15 veya karbonhidrat profillerine sahip tohumlar, geliştirilmiş besin özelliklerine sahip gıdalar veya hastalık ve strese karşı artırılmış direnç sahip bitkiler dahil olmak üzere yüksek değerli mahsulleri oluşturmak için metabolik yolların yeniden düzenlenmesi için gerekli genetik cerrahiyi gerçekleştirmek
20 mümkündür. Hayvanlarda (ör. memeliler) gen hedeflemesi hastalığın tedavisi için kullanılabilir. Örneğin, gen hedeflemesi, farklı mutasyon tiplerine bağlı olarak defektif olan genlerde düzeltmelerin yapılması için kullanılabilir. Bu gen hedeflemesi için etkili yöntemlere ulaşılması zor olmuştur.

25 BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

- Xanthomonas genusundaki bitki patojenik bakterilerinin TAL efektörleri barındırıcı DNA'ya bağlanarak ve efektöre özgü barındırıcı genleri aktifleştirerek, hastalıkta önemli rol oynamakta veya savunmayı tetiklemektedir (bkz. ör. Gu ve ark.
30 (2005) Nature 435:1122; Yang et al. (2006) Proc. Natl. Acad.

- Sci. USA 103:10503; Kay et al. (2007) Science 318:648; Sugio et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:10720; and Römer et al. (2007) Science 318:645). Spesifiklik eksik, tipik olarak 34 amino asit tekrarının efektöre bağlı değişen sayısına bağlıdır.
- 5 (Schomack et al. (2006) J. Plant Physiol. 163:256). Polimorfizmler temel olarak 12 ve 13 tekrar pozisyonlarında mevcuttur ve bunlara bundan sonra tekrar değişken direzidü (RVD) adı verilecektir. Mevcut buluş kısmen TAL efektörlerinin RVD'lerinin, belli düzeyde dejenerasi ile ve herhangi bir açık
- 10 bağlam bağıllılığı olmaksızın, doğrudan, lineer bir şekilde, bir RVD bir nükleotide olacak şekilde hedef sahalarındaki nükleotitlere karşılık geldiği gerçeğine dayanmaktadır. Bu şaşırtıcı bulgu, yeni hedef özgü TAL efektörü için hedef sahasına özgü tahmini sağlayan protein-DNA tanınması için bir yeni
- 15 mekanizmayı temsil etmektedir. Burada tarif edildiği üzere, bu proteinler genom mühendisliğinde homolog rekombinasyonunu kolaylaştırabilecek hedeflenmiş şimerik nükleazlar olarak araştırma ve biyo teknolojide kullanılabilir (ör. bitkilerde biyo yakıt veya biyo yenilenebilirler için kullanışlı nitelikler
- 20 eklemek veya geliştirmek için). Bu proteinler aynı zamanda transkripsiyon faktörleri olarak, ve özellikle sınırlandırıcı olmayan örnekler olarak patojenlere (ör. viüslere) karşı terapötikler olarak yüksek seviyede bir spesifiklik gerektiren terapötik uygulamalar için kullanışlı olabilir.
- 25 Bir yönde mevcut açıklama bir hücrenin genetik malzemesini modifiye etmek için bir yöntem özelliğini açıklamaktadır ve bu,
- (a) bir hedef DNA dizisini içeren bir hücrenin sağlanması; ve
- (b) hücreye bir transkripsiyon aktivatör benzeri (TAL) efektörü-DNA modifiye eden enziminin dahil edilmesinden
- 30 oluşmaktadır ve TAL efektörü-DNA modifiye eden enzimi;
- (i) çift iplikli DNA'yı modifiye edebilen bir DNA modifiye eden enzim etki alanından, ve
- (ii) kombinasyon halinde hedef DNA dizisindeki bir spesifik nükleotit dizisine bağlanan birden fazla TAL efektör tekrar

dizisinden oluşan bir TAL efektör etki alanından oluşmaktadır, öyle ki, TAL efektörü DNA modifiye eden enzim, bir hücresi veya progenisinde spesifik nükleotit dizisi içinde veya buna bitişik hedef DNA'yı modifiye etmektedir. Yöntem aynı zamanda, hücreye, 5 hedef DNA dizisinin en azından bir kısmına bir dizi homologdan oluşan bir nükleik asit sağlanmasından oluşabilir, böylelikle homolog rekombinasyon hedef DNA dizisi ve nükleik asit arasında oluşur. Hücre bir ökaryotik hücre, bir memeli hücre, bir bitki hücresi veya bir prokaryotik hücre olabilir. Hedef DNA 10 kromozomal DNA olabilir. Dahil etme işlemi şunlardan oluşabilir: hücrenin, TAL efektörü DNA modifiye eden enzimini kodlayan bir vektör ile hücreye transfekte edilmesi; Mekanik olarak TAL efektörü DNA modifiye eden enziminin bir protein olarak hücreye enjekte edilmesi; 15 Bateriyal tip III salgı sistemi aracılığıyla bir protein olarak hücreye TAL efektörü DNA modifiye eden enzimin aktarılması; veya Elektroporasyonla TAL efektörü DNA modifiye eden enziminin bir protein olarak hücreye dahil edilmesi. DNA modifiye eden enzim bir endonükleaz (ör. FokI gibi tip II restriksiyon endonükleazı) 20 olabilir.

Hedef DNA içinde bir spesifik nükleotit dizisine bağlanan TAL efektör etki alanı 10 veya daha fazla DNA bağlanma tekrarından ve tercihan 15 veya daha fazla DNA bağlanma tekrarından oluşabilir. Her bir DNA bağlanma tekrarı, hedef DNA dizisindeki 25 bir baz çiftin tanınmasını tespit eden bir tekrar değişken - direzidü (RVD) içerebilir ki burada her bir DNA bağlanma tekrarı, hedef DNA dizisindeki bir baz çiftinin tanınmasından sorumludur ve RVD aşağıdakilerin bir veya birden fazlasından oluşur:

C'yi tanımak için HD;

30 T'yi tanımak için NG;

A'yı tanımak için NI;

G veya A'yı tanımak için NN;

A veya C veya G veya T'yi tanımak için NS;

C veya T'yi tanımak için N* ki burada *, RVD'nin ikinci 35 pozisyonunda bir boşluğu temsil etmektedir; T'yi tanımak için

HG;

T'yi tanımak için H*, ki burada *, RVD'nin ikinci pozisyonunda bir boşluğu temsil etmektedir;

T'yi tanımak için IG;

5 C'yi tanımak için HA;

C'yi tanımak için ND;

C'yi tanımak için HI;

G'yi tanımak için HN;

G'yi tanımak için NA;

10 G veya A'yı tanımak için SN; ve

T'yi tanımak için YG;

Her bir DNA bağlanma tekrarı, hedef DNA dizisindeki bir baz çiftin tanınmasını tespit eden bir RVD içerebilir ki burada her bir DNA bağlanma tekrarı, hedef DNA dizisindeki bir baz çiftinin

15 tanınmasından sorumludur ve RVD aşağıdakilerin bir veya birden fazlasından oluşur:

C'yi tanımak için HA;

C'yi tanımak için ND;

C'yi tanımak için HI;

20 G'yi tanımak için HN;

G'yi tanımak için NA;

G veya A'yı tanımak için SN;

T'yi tanımak için YG; ve

G'yi tanımak için NK; ve aşağıdakilerden bir veya birden fazlası:

25 C'yi tanımak için HD;

T'yi tanımak için NG;

A'yı tanımak için NI;

G veya A'yı tanımak için NN;

A veya C veya G veya T'yi tanımak için NS;

30 C veya T'yi tanımak için N*, ki burada *, RVD'nin ikinci pozisyonunda bir boşluğu temsil etmektedir;

T'yi tanımak için HG;

T'yi tanımak için H*, ki burada *, RVD'nin ikinci pozisyonunda bir boşluğu temsil etmektedir;

Diğer bir yönde, mevcut açıklama, bir seçilen nükleotit dizisi için spesifik bir TAL efektörünü kodlayan bir nükleik asidi üretmek için bir yöntemi içermektedir ve bu şunlardan oluşmaktadır: (1) başlatıcının, birinci TAL efektörü DNA bağlanma
5 tekrar etki alanının 3' ucunda bir özgün PspXI alanına sahip olduğu, seçilen nükleotit dizinin birinci nükleotiti için spesifik bir tekrar değişken direzidü (RVD)'ye sahip bir birinci TAL efektör DNA bağlanma tekrar etki alanını kodlayan bir nükleotit dizisinden oluştuğu, bir başlatıcı plazmitin PspXI ile
10 linearize edilmesi; ve

(2) başlatıcı plazmiti PspXI sahasına, DNA modülünün XhoI yapışkan uçlara sahip olduğu, seçilen nükleotit dizisinin bir sonraki nükleotitleri için spesifik RVD Tere sahip bir veya daha fazla TAL efektör DNA bağlanma tekrar etki alanlarını kodlayan
15 bir DNA modülünün eklenmesi;

ve (3) nükleik asit, seçilen nükleotit diziyeye bağlanma kapasitesine sahip bir TAL efektörünü kodlayana kadar, (1) ve (2) adımlarının tekrar edilmesi.

Yöntem aynı zamanda, bağlanmadan sonra, PspXI sahasında DNA
20 modülünün oryantasyonun tespit edilmesinden oluşabilir. Yöntem bir ila 30 kere arası (1) ve (2) adımlarının tekrar edilmesinden oluşabilir.

Diğer bir yönde, mevcut açıklama, bir transkripsiyon aktivatör benzeri efektör endonükleazı (TALEN) kodlayan bir nükleik asidi
25 üretmek için bir yöntemi içermektedir ve bu şunlardan oluşmaktadır:

(a) bir hücrenin genomunda bir birinci nükleotit dizisinin tanımlanması; ve
(b) aşağıdakilerden oluşan bir TALEN'i kodlayan bir nükleik
30 asidin sentezlenmesi:

(i) kombinasyon halinde birinci özgün nükleotit dizisine

bağlanan birden fazla DNA bağlanma tekrarları; ve

(ii) birinci nükleotit dizi içinde veya bitişiğindeki bir pozisyonda bir çift iplikli kesim üreten bir endonükleaz;

(iii)

- 5 ki burada her bir DNA bağlanma tekrarı, hedef DNA'da bir baz çiftinin tanınmasını tespit eden bir RVD'den oluşmaktadır, ve burada her bir DNA bağlanma tekrarı, hedef DNA'da bir baz çiftinin tanınmasından sorumludur; ve burada TALEN aşağıdaki RVD'lerden bir veya birden fazlasından
- 10 oluşmaktadır: C'yi tanımak için HD;
T'yi tanımak için NG;
A'yi tanımak için NI;
G veya A'yi tanımak için NN;
A veya C veya G veya T'yi tanımak için NS;
- 15 C veya T'yi tanımak için N*
T'yi tanımak için HG;
T'yi tanımak için H*;
T'yi tanımak için IG;
G'yi tanımak için NK;
- 20 C'yi tanımak için HA;
C'yi tanımak için ND;
C'yi tanımak için HI;
G'yi tanımak için HN;
G'yi tanımak için NA;
- 25 G veya A'yi tanımak için SN; ve T'yi tanımak için YG;
burada TALEN aşağıdaki RVD'lerden bir veya birden fazlasından oluşmaktadır: C'yi tanımak için HA;
C'yi tanımak için ND;
C'yi tanımak için HI;
- 30 G'yi tanımak için HN;
G'yi tanımak için NA;
G veya A'yi tanımak için SN;
T'yi tanımak için YG;

ve aşağıdakilerden bir veya birden fazlası;

C'yi tanımak için HD;

T'yi tanımak için NG;

A'yı tanımak için NI;

5 G veya A'yı tanımak için NN;

A veya C veya G veya T'yi tanımak için NS;

C veya T'yi tanımak için N*

T'yi tanımak için HG;

T'yi tanımak için H*;

10 ve T'yi tanımak için IG;

Birinci nükleotit dizisi, aşağıdaki kriterlerden en az birisini karşılayabilir: i) 5' ucunda sahadan hemen önceki bir T ile 5' ile 3' arasında yer alır ve en az 15 bazlık uzunluktadır;

ii) birinci (5') pozisyonunda bir T'ye ve ikinci pozisyonda

15 bir A'ya sahip değildir;

iii) son (3') pozisyonunda T'de biter ve son pozisyona bitişik bir G'ye sahip değildir; ve

iv) 0-63% A, 11-63% C, 0-25% G, ve 2-42% T'lik bir baz bileşime sahiptir. Yöntem aynı zamanda hücrenin genomunda bir

20 birinci nükleotit dizisinin ve bir ikinci nükleotit dizisinin tanımlanmasından oluşabilir ve burada birinci ve ikinci nükleotit dizisi, yukarıda belirtilmiş olan kriterlerden en az birini karşılar ve 1518 bp ile ayrılır. Endonükleaz, birinci ve ikinci nükleoti dizileri arasında bir çift iplikli kesim
25 üretebilir.

Diğer bir yapılandırmada, mevcut buluş, bir endonükleaz etki alanından oluşan bir TALEN ve bir hedef DNA için spesifik bir TAL efektörü DNA bağlanma etki alanının özelliklerini göstermektedir,

30 burada DNA bağlanma etki alanı birden fazla DNA bağlanma tekrarından oluşmaktadır ve her bir tekrar, hedef DNA'da bir baz çiftinin tanınmasını tespit etmektedir,

ve burada her bir DNA bağlanma tekrarlı, hedef DNA'da bir baz

çiftinintanınımasından sorumludur; ve

burada TALEN aşağıdaki RVD'lerden bir veya birden fazlasından oluşmaktadır:

- C'yi tanımak için HD;
- 5 T'yi tanımak için NG;
A'yı tanımak için NI;
G veya A'yı tanımak için NN;
A veya C veya G veya T'yi tanımak için NS;
C veya T'yi tanımak için N*
- 10 T'yi tanımak için HG;
T'yi tanımak için H*;
T'yi tanımak için IG;
G'yi tanımak için NK;
C'yi tanımak için HA;
- 15 C'yi tanımak için ND;
C'yi tanımak için HI;
G'yi tanımak için HN;
G'yi tanımak için NA;
G veya A'yı tanımak için SN; ve
- 20 T'yi tanımak için YG;
burada TALEN aşağıdaki RVD'lerden bir veya birden fazlasından oluşmaktadır: C'yi tanımak için HA;
C'yi tanımak için ND;
C'yi tanımak için Hl;
- 25 G'yi tanımak için HN;
G'yi tanımak için NA;
G veya A'yı tanımak için SN;
T'yi tanımak için YG; ve
G'yi tanımak için NK;
- 30 ve aşağıdakilerden bir veya birden fazlası; T'yi tanımak için NG;

A'yı tanımak için NI;
G veya A'yı tanımak için NN;

A veya C veya G veya T'yi tanımak için NS;

C veya T'yi tanımak için N*

T'yi tanımak için HG;

T'yi tanımak için H*; ve

5 T'yi tanımak için IG;

Endonükleaz etki alanı, bir tip II kısıtlama endonükleazından olabilir (ör. FokI). Diğer bir yönde, mevcut buluş bir endonükleaz etki alanı ve bir TAL efektör etki alanından oluşan bir TALEN'i içermektedir,

10 burada söz konusu TALEN'in amino asit dizisi, SEQ ID NO:33 ila SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:72, ve SEQ ID NO:73'ten oluşan gruptan seilmektedir. Mevcut buluş, bir hayvanı üretmek için bir yöntemin özelliklerini içermektedir ve bu, aşağıdakilerden oluşmaktadır:

15 bir jenerik modifikasyon üretmek için arzu edilebilir olan bir hedef DNA dizisinden oluşan bir ökaryotik hücrenin sağlanması; bir endonükleaz etki alanı ve hedef DNA dizisine bağlanan bir TAL efektör etki alanından oluşan, bir TALEN ile hedef DNA dizisi içinde bir çift iplikli kesimin üretilmesi;

20 ve bir çift iplikli kesimin gerçekleştirildiği hücre veya progenisinden bir hayvanın üretilmesi. Yöntem aynı zamanda şunlardan oluşabilir;

dahil etme işleminin, egzogenöz nükleik asit ve hücre veya progenisindeki hedef DNA dizisi arasında homolog rekombinasyonun oluşmasına izin veren koşullar altında gerçekleştiği, hedef DNA'nın en az bir kısmına homolog bir diziden oluşan bir egzogenöz nükleik asitin dahil edilmesi;ve homolog rekombinasyonun gerçekleştiği hücre veya progeniden bir hayvanın üretilmesi. Hayvan bir memeli olabilir. Genetik

30 modifikasyon bir ikame, ekleme veya bir silmeden oluşabilir. Diğer yönde, mevcut açıklama bir bitkinin üretilmesi için bir yöntem özelliklerini bir önceden seçilmiş jenerik modifikasyon üretmek için arzu edilebilir olan bir

hedef DNA dizisinden oluşan bir bitki hücresinin sağlanması;

35 bir endonükleaz etki alanı ve hedef DNA dizisine bağlanan bir

TAL efektör etki

alanından oluşan, bir TALEN ile hedef DNA dizisi içinde bir çift iplikli kesimin üretilmesi;

5 ve bir çift iplikli kesimin gerçekleştiği hücre veya progenisinden bir bitkinin üretilmesi. Yöntem aynı zamanda şunlardan oluşabilir;

dahil etme işleminin, egzogenöz nükleik asit ve hücre veya progenisindeki hedef DNA dizisi arasında homolog rekombinasyonun oluşmasına izin veren koşullar altında gerçekleştiği, hedef DNA dizisinin en az bir kısmına homolog bir diziden oluşan bir egzogenöz nükleik asitin dahil edilmesi;ve

10 homolog rekombinasyonun gerçekleştiği hücre veya progeniden bir bitkinin üretilmesi.

Diğer bir yönde, mevcut buluş bir hücrede hedeflenen genetik rekombinasyon için bir yöntem özelliğini sergilemektedir ve şunlardan oluşmaktadır; hücreye, bir seçilen DNA hedef dizisine hedeflenen bir TAL efektör endonükleazı kodlayan bir

20 nükleik asidin dahil edilmesi;

hücre içinde TAL efektörü endonükleazımn ekspresyonuna neden olunması; seçilen DNA hedef dizisinin bir mutasyon sergilediği bir hücrenin tanımlanması. Mutasyon genetik malzemenin silinmesi, genetik malzemenin eklenmesi, ve genetik malzemenin hem silinmesi hem de eklenmesinden oluşan gruptan seçilebilir. Yöntem, aynı zamanda hücreye donör DNA'sını eklenmesinden oluşabilir. Hücre bir böcek hücresi, bir bitki hücresi, bir balık hücresi veya bir memli hücresi olabilir.

Diğer yönde, mevcut açıklama, bir hedef DNA için geliştirilmiş hedefleme kapasitesine sahip bir TAL efektörü üretmek için bir yöntemi açıklamaktadır ve yöntem şunlardan oluşmaktadır; birden fazla DNA bağlanma tekrarlarına sahip DNA bağlanma etki alanından

oluşan birTAL efektörünü kodlayan bir nükleik asit üretilmesi;

35 ki burada her bir tekrar, hedef DNA'da bir baz çiftinin

tanınmasını tespit eden bi ve burada her bir DNA bağlanma tekrarlı, hedef DNA'da bir baz çiftinin tanınmasından sorumludur;

5 ve burada üretme, A, C veya G için spesifikliğe sahip bir varyant O'uncu DNA bağlama tekrar dizisini kodlayan bir nükleik asit dahil edilmesi ve böylelikle bağlanma sahasının -1 pozisyonunda T için gerekliliğin ortadan kaldırılmasından oluşmaktadır.

10 Diğer yönde, mevcut açıklama, bir hedef DNA için geliştirilmiş hedefleme kapasitesine sahip bir TAL efektörü üretmek için bir yöntemi açıklamaktadır ve yöntem şunlardan oluşmaktadır;

birden fazla DNA bağlanma tekrarlarına sahip DNA bağlanma etki alanından oluşan bir TAL efektörünü kodlayan bir nükleik asit üretilmesi; ki burada her bir tekrar, hedef DNA'da bir baz
15 çiftinin tanınmasını tespit eden bir RVD'den oluşmaktadır, ve burada her bir DNA bağlanma tekrarlı, hedef DNA'da bir baz çiftinin tanınmasından sorumludur;

ve burada üretme, G için geliştirilmiş spesifikliğe sahip RVD Ter içeren TAL efektör DNA'yı kodlayan bir veya daha fazla
20 nükleik asidin dahil edilmesinden oluşmaktadır ve burada söz konusu RVD'ler RN, R*, NG, NH, KN, K*, NA, NT, DN, D*, NL, NM, EN, E*, NV, NC, QN, Q*, NR, NP, HN, H*, NK, NY, SN, S*, ND, NW, TN, T*, NE, NF, YN, Y*, ve NQ'dan oluşan gruptan seçilmiştir,

25 burada * RVD'nin ikinci pozisyonundaki bir boşluğu göstermektedir. Mevcut buluş aynı zamanda bir hedef DNA dizisindeki en az bir baz çiftini seçici olarak tanıyan bir polipeptitin üretilmesi için bir yöntemi açıklamaktadır ve bu yöntem şunlardan oluşmaktadır;

30 bir tekrar etki alanından oluşan bir polipeptitin sentezlenmesi; ki burada tekrar etki alanı, bir transkripsiyon aktivatör benzeri (TAL) efektöründen türetilen en az bir tekrar biriminden oluşmaktadır.

burada tekrar birimi, hedef DNA dizisinde bir baz çiftinin
35 tanınmasını tespit eden bir hiper değişken bölgeden

oluşmaktadır, burada tekrar birimi, DNA dizisinde bir baz çiftinin tanınmasından sorumludur, ve

burada hiper değişken bölge, aşağıdakilerden oluşan gruptan

5 seçilen bir elemandan oluşmaktadır:

- (a) C/G'nin tanınması için HD;
- (b) A/T'nin tanınması için NI;
- (c) T/A'nın tanınması için NG;
- (d) C/G veya A/T veya T/A veya G/C'nin tanınması için NS;
- 10 (e) G/C veya A/T'nin tanınması için NN;
- (f) T/A'nın tanınması için IG;
- (g) C/G'nin tanınması için N;
- (h) C/G veya T/A'nın tanınması için HG;
- (i) T/A'nın tanınması için H; ve
- 15 (j) G/C'nin tanınması için NK;

Buna ek olarak, bu buluş, yukarıdaki yöntemle üretilen bir polipeptiti ve yöntem ile üretilen polipeptit için bir kodlama dizisinden oluşan bir DNA'yı içermektedir. Ayrıca, yukarıda belirtilmiş olan DNA ile işlevsel olarak bağlanmış bir

20 promotörden oluşan bir ekspresyon kasetidir ve ekspresyon kasetinden oluşan bir insan dışı barındırıcı hücredir. Diğer yönden, mevcut buluş, ekspresyon kasetinden oluşan bir dönüştürülmüş, insan dışı organizma özelliğini sergilemektedir.

Diğer bir yönde, mevcut buluş, bir polipeptit tarafından bir

25 DNA dizisinde bir baz çiftinin seçici olarak tanımlanması için bir yöntem özelliğini içermektedir ve budunlardan oluşmaktadır: bir tekrar etki alanından oluşan bir polipeptitin inşa edilmesi; ki burada tekrar etki alanı, bir (TAL) efektöründen türetilen en az bir tekrar biriminden oluşmaktadır.

30 burada tekrar birimi, DNA dizisinde bir baz çiftinin tanınmasını tespit eden bir hiper değişken bölgeden oluşmaktadır,

burada tekrar birimi, DNA dizisinde bir baz çiftinin tanınmasından sorumludur, ve burada hiper değişken bölge, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen bir elemandan

35 oluşmaktadır:

- (a) C/G'nin tanınması için HD;
- (b) A/T'nin tanınması için NI;
- (c) T/A'nın tanınması için NG;
- 5 (d) C/G veya A/T veya T/A veya G/C'nin tanınması için NS;
- (e) G/C veya A/T'nin tanınması için NN;
- (f) T/A'nın tanınması için IG;
- (g) C/G'nin tanınması için N;
- (h) C/G veya T/A'nın tanınması için HG;
- 10 (i) T/A'nın tanınması için H; ve
- (j) G/C'nin tanınması için NK;

Mevcut buluş aynı zamanda bir hücrede bir hedef genin ekspresyonunu modüle etmenin bir yöntemini içermektedir;

- ki burada, polipeptitin bir tekrar etki alanından oluştuğu bir polipeptit içeren hücreler sağlanmaktadır;

- 15 ki burada tekrar etki alanı, bir (TAL) efektöründen türetilen en az bir tekrar biriminden oluşmaktadır,

burada tekrar birimi, DNA dizisinde bir baz çiftinin tanınmasını tespit eden bir hiper değişken bölgeden oluşmaktadır,

- 20 burada tekrar birimi, DNA dizisinde bir baz çiftinin tanınmasından sorumludur, ve burada hiper değişken bölge, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen bir elemandan oluşmaktadır;

- (a) C/G'nin tanınması için HD;
- 25 (b) A/T'nin tanınması için NI;
- (c) T/A'nın tanınması için NG;
- (d) C/G veya A/T veya T/A veya G/C'nin tanınması için NS;
- (e) G/C veya A/T'nin tanınması için NN;
- (f) T/A'nın tanınması için IG;
- 30 (g) C/G'nin tanınması için N;
- (h) C/G veya T/A'nın tanınması için HG;
- (i) T/A'nın tanınması için H; ve
- (j) G/C'nin tanınması için NK;

- Diğer bir yönde, mevcut buluş, bir tekrar etki alanından oluşan bir polipeptit özelliklerini sergilemektedir;

35

ki burada tekrar etki alanı, bir (TAL) efektöründen türetilen en az bir tekrar biriminden oluşmaktadır.

burada tekrar birimi, DNA dizisinde bir baz çiftinin tanınmasını tespit eden bir hiper değişken bölgeden oluşmaktadır,

5 burada tekrar birimi, DNA dizisinde bir baz çiftinin tanınmasından sorumludur, ve burada hiper değişken bölge, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen bir elemandan oluşmaktadır:

- (a) C/G'nin tanınması için HD;
- 10 (b) A/T'nin tanınması için NI;
- (c) T/A'nın tanınması için NG;
- (d) C/G veya A/T veya T/A veya G/C'nin tanınması için NS;
- (e) G/C veya A/T'nin tanınması için NN;
- (f) T/A'nın tanınması için IG;
- 15 (g) C/G'nin tanınması için N;
- (h) C/G veya T/A'nın tanınması için HG;
- (i) T/A'nın tanınması için H; ve
- (j) G/C'nin tanınması için NK;

Mevcut buluş aynı zamanda yukarıda belirtilmiş olan polipeptit için bir kodlama dizisinden oluşan bir DNA özelliğine sahiptir. Diğer yönde, mevcut buluş bir hedef DNA'da yer alan bir baz çiftini içerecek şekilde modifiye edilmiş bir DNA özelliğine sahiptir, böylelikle baz çifti, bir tekrar etki alanından oluşan bir polipeptit tarafından spesifik olarak tanınabilecektir;

25 ki burada tekrar etki alanı, bir (TAL) efektöründen türetilen en az bir tekrar biriminden oluşmaktadır.

burada tekrar birimi, DNA dizisinde bir baz çiftinin tanınmasını tespit eden bir hiper değişken bölgeden oluşmaktadır,

burada tekrar birimi, DNA dizisinde bir baz çiftinin tanınmasından sorumludur, ve burada, hiper-değişen bölge tarafından bir seçici ve tespit edilmiş tanıma almak için, baz çifti aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilmiştir;

- (a) HD'nin tanınması için C/G;
- (b) NI'nin tanınması için A/T;
- 35 (c) NG'nin tanınması için T/A;

- (d) NS tarafından tanınmak için CT veya A/T veya T/A veya G/C;
(e) NN 'nin tanınması için G/C veya A/T;
(f) !G'nin tanınması için T/A;
(g) N 'nin tanınması için C/G veya T/A;
- 5 (h) HG'nin tanınması için T/A;
(i) H'nin tanınması için T/A; ve
(j) NK'nin tanınması için G/C; Ayrıca yukarıda belirtilmiş olan DNA, DNA'dan oluşan bir insan dışı barındırıcı hücre, DNA'dan oluşan bir dönüştürülmüş, insan dışı organizmadan oluşan
- 10 bir vektör bulunmaktadır.
- Diğer bir yönde, mevcut buluş, bir tekrar etki alanından oluşan bir polipeptit tarafından seçici olarak tanınan bir hedef DNA dizisinden oluşan bir DNA üretmek için bir yöntemi içermektedir, ki burada tekrar etki alanı, bir (TAL) efektöründen türetilen
- 15 en az bir tekrar biriminden oluşmaktadır,
- burada tekrar birimi, hedef DNA dizisinde bir baz çiftinin tanınmasını tespit eden bir hiper değişken bölgeden oluşmaktadır, ve
- burada tekrar birimi, hedefDNA dizisinde bir baz çiftinin
- 20 tanınmasından sorumludur, ve
- yöntem, tekrar birimi tarafından tanınma kapasitesine sahip bir baz çiftinden oluşan bir DNA'yı sentezlemeden oluşmaktadır; burada baz çifti, şunlardan oluşan gruptan seçilir;
- 25 (a) HD'nin tanınması için C/G;
(b) NI'nin tanınması için A/T;
(c) NG'nin tanınması için T/A;
(d) NS tarafından tanınmak için CT veya A/T veya T/A veya G/C;
(e) NN 'nin tanınması için G/C veya A/T;
- 30 (f) IG'nin tanınması için T/A;
(g) N 'nin tanınması için C/G veya T/A;
(h) HG'nin tanınması için T/A;
(i) H'nin tanınması için T/A; ve
(j) NK'nin tanınması için G/C; Bir yönde mevcut açıklama bir
- 35 bitki hücresinin genetik malzemesini modifiye etmek için bir

yöntem özelliğini açıklamaktadır ve bu, Yöntem şunları içerebilir:

(a) bitki hücrelerine şunların dahil edilmesi;

(i) bir modifiye edilmiş hücre nükleotit dizisinden oluşan bir
5 birinci rekombinant nükleik asit;

ki burada modifiye edilmiş hedef nükleotit dizi, bitki hücrelerinde mevcut olan bir karşılık gelen hedef nükleotit dizisine göre nükleotit dizisinde bir veya daha fazla modifikasyondan oluşmaktadır; ve hedef nükleotit dizisi ayrıca
10 bir diziyse özgü TAL efektör endonükleazı (TALEN) için bir tanıma sahasından oluşmaktadır; ve

(ii) diziyse özgü transkripsiyon aktivatör benzeri (TAL) efektör endonükleazını kodlayan bir nükleotit dizisinden oluşan bir
ikinci rekombinant nükleik asit;

15 (b) bitki hücrelerini içeren bir bitkinin üretilmesi;

(c) bitkiden veya progenisinden elde edilen hücrelerin, tohumun veya dokunun, hedef nükleotit dizisinde rekombinasyon için analiz edilmesi. Yöntem aynı zamanda bitki hücrelerine (iii) bir seçilebilir markörü kodlayan bir nükleotit dizisinden oluşan
20 bir üçüncü rekombinant nükleik asidin dahil edilmesi; ve bitki veya progenisinin seçilebilir markörü eksprese edip etmediğinin tespit edilmesini de içerebilir. Yöntem aynı zamanda bitki veya progenisinin seçilebilir markörün yokluğu bakımından taramasını adımını da içerebilir. Seçilebilir markörü kodlayan

25 nükleotit dizisi, bitki hücresi için endogenöz olan bir diziyse benzer veya onunla aynı bir dizi tarafından bir veya her iki tarafından desteklenebilir veya desteklenmeyebilir (ör. bir ikinci diziyse özgü nükleaz için klevaj sahasında bir dizi).

Seçilebilir markörü kodlayan nükleotit dizi, bir diziyse özgü
30 rekombinas için tanıma sahaları tarafından her iki taraftan desteklenebilir. Yöntem aynı zamanda, seçilebilir markörün yokluğu için out-cross'un progenisini tarama adımı ile veya bu adım olmaksızın, bitkinin out-cross yapılmasını adımını içerebilir. Birinci ve ikinci rekombinant nükleik asitleri,

35 bitki hücrelerine eş zamanlı olarak dahil edilebilir. Rekombinant

nükleik asitlerden biri veya her ikisi, dahil etme adımından önce liierize edilebilir. Birinci ve ikinci rekombinant nükleik asitleri, aynı konstrükt içinde mevcut olabilir. Bir yönde mevcut açıklama bir bitki hücresinin genetik malzemesini

5 açıklamak için bir yöntem özelliğini açıklamaktadır ve bu, Yöntem şunları içerebilir:

Homolog rekombinasyonun oluşmasının istendiği kromozomal hedef DNA dizisini içeren bir primer hücrenin sağlanması;

çift iplikli DNA'yı bölebilecek bir endonükleaz etki alanından

10 oluşan bir TALEN'in, ve kombinasyon halinde hücredeki hedef DNA içinde bir spesifik nükleotit dizisine bağlanan birden fazla TAL efektörü tekrar dizisinden oluşan bir TAL efektörü etki alanının sağlanması;

ve hedef DNA dizisinin hücredeki TALEN ile temas ettirilmesi

15 suretiyle, TALEN'in, hücredeki hedef DNA dizisi içindeki veya buna bitişik bir nükleotit dizisinin her iki ipliğini ayırması.

Yöntem aynı zamanda, hücreye, hedef DNA dizisinin en azından bir kısmına bir dizi homologdan oluşan bir nükleik asit sağlanmasından oluşabilir, böylelikle homolog rekombinasyon

20 hedef DNA dizisi ve nükleik asit arasında oluşur. Hedef DNA dizisi, hücreye endogenöz olabilir. Hücre bir bitki hücresi, bir memeli hücresi, bir balık hücresi, bir böcek hücresi veya in vitro kültürler için bu organizmalardan türetilen hücre hatları veya canlı dokulardan doğrudan alınan ve in vitro kültür

25 için tespit edilen primer hücreler olabilir. Temas ettirme şunları içerebilir:

Hücrenin, bir TALEN kodlama dizisinden oluşan bir vektör ile transfekte edilmesi; ve

hücredeki TALEN proteininin eksprese edilmesi;

30 bir TALEN proteininin hücreye mekanik olara enjekte edilmesi; bakteriyal tip III salgı sistemi aracılığıyla hücreye bir TAL efektörü endonükleaz proteininin aktarılması; veya

elektroporasyonla hücreye bir TALEN proteininin dahil edilmesi. Endonükleaz etki alanı, bir tip II kısıtlama endonükleazından

35 olabilir (ör. FokI). Hedef DNA içinde bir spesifik nükleotit

dizisine bağlanan TAL efektör etki alanı 10 veya daha fazla DNA bağlanma tekrarından ve tercihan 15 veya daha fazla DNA bağlanma tekrarından oluşabilir. Hücre herhangi bir prokaryotik veya ökaryotik organizma olabilir.

5 Diğer bir yönde, mevcut buluş, spesifik bir lokasyonda DNA'yı ayırma kapasitesine sahip olan bir diziye özgü TALEN'i tasarlamak için bir yöntem özelliği sergilemektedir. Yöntem şunları içerebilir:

10 bir çift iplikli kesim sağlamanın arzu edildiği bir ikinci nükleotit dizisine bitişik bir birinci özgün endogenöz kromozomal nükleotit dizinin tanımlanması; ve (a) kombinasyon halinde birinci özgün endogenöz kromozomal nükleotit dizisine bağlanan birden fazla DNA bağlanma tekrar etki alanlarından, ve (b) ikinci nükleotit dizisinde bir çift iplikli kesme üreten
15 bir endonükleazdan oluşan bir diziyse özgü TALEN'in tasarlanması.

Mevcut buluş, bir endonükleaz etki alanından oluşan bir TALEN ve özel bir DNA dizisi için spesifik bir TAL efektörü DNA bağlanma etki alanının özelliklerini göstermektedir, TALEN
20 ayrıca bir saflaştırma etiketi içerebilir. Endonükleaz etki alanı, bir tip II kısıtlama endonükleazından olabilir (ör. FokI).

Diğer bir yönde, mevcut buluş, içine bir istenilen nükleik asidin dahil edildiği bir genetik olarak modifiye edilmiş
25 hayvanın üretilmesi için bir yöntem özelliği sergilemektedir. Yöntem şunları içerebilir:

İçine nükleik asidin sokulmasının istendiği bir endogenöz kromozomal hedef DNA dizisinden oluşan bir primer hücrenin sağlanması;

30 bir endonükleaz etki alanı ve endogenöz kromozomal hedef DNA dizisine bağlanan bir TAL efektör etki alanından oluşan, bir TALEN ile endogenöz kromozomal hedef DNA dizisi içinde bir çift iplikli kesimin üretilmesi; egzogenöz nükleik asit ve endogenöz kromozomal hedef DNA arasında homolog rekombinasyonun
35 gerçekleşmesine izin veren koşullar altında primer hücreye

endogenöz kromozomal hedef DNA'nın en az bir kısmına homolog bir diziden oluşan bir egzogenöz nükleik asidin dahil edilmesi; ve homolog rekombinasyonun gerçekleştiği primer hücreden bir hayvanın üretilmesi. Hayvan bir memeli olabilir. Homolog dizi, 5 homolog rekombinasyondan sonra bir geni tahrip eden bir nükleotit dizi, homolog rekombinasyondan sonra bir genin yerini alan bir nükleotit dizi, homolog rekombinasyondan sonra bir gene bir nokta mutasyonu ekleyen bir nükleotit dizi, ve homolog rekombinasyondan sonra bir regülatör sahayı ortaya çıkartan bir 10 nükleotit diziden oluşan gruptan seçilen bir nükleotit dizi olabilir.

Diğer bir yönde, mevcut buluş, içine bir istenilen nükleik asidin dahil edildiği bir genetik olarak modifiye edilmiş bitkinin üretilmesi için bir yöntem özelliği sergilemektedir.

15 Yöntem şunları içerebilir:

içine nükleik asidin sokulmasının istendiği bir endogenöz hedef DNA dizisinden oluşan bir bitki hücresinin sağlanması;

bir endonükleaz etki alanı ve endogenöz hedef nükleotit dizisine bağlanan bir TAL efektör etki alanından oluşan, bir TALEN ile 20 hedef DNA dizisi içinde bir çift iplikli kesimin üretilmesi;

egzogenöz nükleik asit ve endogenöz hedef DNA arasında homolog rekombinasyonun gerçekleşmesine izin veren koşullar altında bitki hücrelerine endogenöz hedef DNA'nın en az bir kısmına homolog bir diziden oluşan bir egzogenöz nükleik asidin dahil 25 edilmesi; ve

homolog rekombinasyonun gerçekleştiği bitki hücreden bir bitkinin üretilmesi. Diğer bir yönde, mevcut buluş bir hücrede hedeflenen genetik rekombinasyon için bir yöntem özelliğini sergilemektedir. Yöntem şunları içerebilir:

30 hücreye, bir seçilen DNA hedef dizisine hedeflenen bir TALEN'i kodlayan bir nükleik asit molekülünün dahil edilmesi;

hücre içinde TALEN'in ekspresyonunun sağlanması; ve

seçilen DNA hedef dizisinin bir mutasyon sergilediği bir hücrenin tanımlanması. Mutasyon genetik malzemenin silinmesi, 35 genetik malzemenin eklenmesi, ve genetik malzemenin hem

silinmesi hem de eklenmesinden oluşan gruptan seçilebilir. Yöntem, aynı zamanda hücreye donör DNA'sını eklenmesinden oluşabilir. Hücre bir böcek hücresi, bir bitki hücresi, bir balık hücresi veya bir memli hücresi olabilir. Diğer bir yönde, 5 mevcut açıklama, bir diziye Özgü TALEN'i kodlayan bir nükleik asidi üretmek için bir yöntemi içermektedir ve bu şunlardan oluşmaktadır:

(1) başlatıcının, birinci TAL efektörü DNA bağlanma tekrar etki alanının 3' ucunda bir özgün PspXI alanına sahip olduğu, seçilen nükleotit dizinin birinci nükleotiti için spesifik bir RVD'ye sahip bir birinci TAL efektör DNA bağlanma tekrar etki alanını kodlayan bir nükleotit dizisinden oluştuğu, bir başlatıcı plazmitin PspXI ile seçilmesi; ve

(2) başlatıcı plazmitin PspXI ile lineerize edilmesi;

(3) PspXI sahasına, DNA modülünün XhoI yapışkan uçlara sahip olduğu, seçilen nükleotit dizisinin bir sonraki nükleotitleri için spesifik RVD'lere sahip bir veya daha fazla TAL efektör DNA bağlanma tekrar etki alanlarını kodlayan bir DNA modülünün eklenmesi; ve

(4) nükleik asit, seçilen nükleotit diziyeye bağlanma kapasitesine sahip bir TALEN kodlayana kadar, (2) ve (3) adımlarının tekrar edilmesi. Bazı durumlarda, yöntem aynı zamanda, adım (3)'teki bağlanmadan sonra, PspXI sahasında DNA modülünün oryantasyonun tespit edilmesinden oluşabilir.

Aksi tanımlanmadığı sürece, burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimler genellikle bu buluşun ait olduğu teknikte normal beceriye sahip bir kişi tarafından yaygın olarak anlaşılan anlamla aynı anlama sahiptir. Her ne kadar burada tarif edilmiş olanlara benzer veya denk olan yöntemler ve malzemeler buluşu uygulamak için kullanılabilsede de, uygun yöntemler ve malzemeler aşağıda tarif edilmiştir. Farklılık durumunda, buradaki tanımlarla birlikte mevcut başvuru geçerli olacaktır. Burada belirtilmiş olan malzemeler, yöntemler ve örnekler sadece örnek amacıyla verilmiştir ve sınırlandırıcı olması amaçlanmamaktadır. Buluşun bir veya daha fazla uygulamasının ayrıntıları, ilişkili çizimlerde ve aşağıdaki tarifte ortaya konmuştur. Buluşun diğer özellikleri, nesneleri ve avantajları, çizimlerden ve tarifnameden ve aynı zamanda istemlerden açıkça anlaşılabilir.

ŞEKİLLERİN AÇIKLAMASI

Şekil 1A-1D ,TAL efektör DNA tanıma şifresini göstermektedir.

Şekil 1A, tekrar bölgesini (açık kutular) gösteren bir jenerik TAL efektörünün ve RVD'nin altı çizili olarak bir temsili tekrar dizisinin (SEQ ID NO:1) bir diyagramıdır.

- 5 Şekil 1B, farklı TAL efektör RVDleri ve hedef gen promotör dizileri (SEQ ID No 2-11) için en iyi patem eşleşmelerini (düşük entropi hizalanmaları) gösteren bir diyagramdır. Bir yıldız, kalıntı 13 'te bir silmeyi göstermektedir.

- 10 Şekil C, her bir efektör için enfeksiyon sırasında aşağı akış geninin aktiveleştirildiği en iyi hizalamayı tutan, 40 ilave X. Oryzae TAL efektörü ile tüm pirinç promotörlerini taramak suretiyle elde edilmiş olan on daha fazla hizalama ile, B'deki hizalamalardaki RVD-nükleotit ilişkilendirmelerini gösteren bir diyagramdır. Şekil 1D, 20 TAL efektör hedef sahaları için yandan destekleyen nükleotit frekanslarını gösteren bir diyagramdır. 15 Pozisyonlar hedef sahanın 5' ucuna göre; N, hedef sahanın uzunluğudur. Logolar WebLogo kullanılarak oluşturulmuştur.

- 20 Şekil 2A ve 2B *OsHen1* 'in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* türü BLS256'nın Tal1c'is ile aktiveleştirildiğinin kanıtını sağlamaktadır. Şekil 2A, yarı kantitatif RT- PCR sonuçlarının bir resmini vermektedir ve burada *OsHen1*'in göreceli olarak transkript bolluğu referans için bir aktin geni ile gösterilmektedir ve bu BLS256 markör değişim mutantı M51 ile inokülasyondan 24 saat sonra pirinç yapraklarında gösterilmekte 25 olup M 51 boş kozmit vektörünü (ev) taşımakta, M51 kozmit pIJF92 taşımaktadır ve bu tali a, tal1b, ve tali e ve yabani tip (WT) türü içermektedir. Şekil 2B, bir markör içeren XmaI fragmanının kurtarma ve uç sıralaması ile M51 'de tek markör alış verişi mutasyonunun haritalanmasına dayalı olarak gösterilen bir 30 şematiktir. Genom bölgesi, kalıntı fragmanın koordinatları ve kozmit pIJF92'de yer alan BLS256 genomik fragmanın koordinatları gösterilmektedir.

ŞEK 3 AvrBs3 amino asit dizisinin (SEÇ ID NO: 12) bir referansıdır.

ŞEK 4 AvrBs3 nüklek asit dizisinin (SEÇ ID NO: 13) bir referansıdır.

- 5 Şekil 5, bir TAL nükleaz ekspresyon vektörünün bir haritasıdır. Şekil 6, bir hedef raportör plazmitinin bir haritasıdır.

Şekil 7, TAL nükleazların şematik mimarisinin bir diyagramıdır, TAL DNA bağlanma etki alanının tanınma sahaları büyük harfler ile temsil edilmekte olup, aralayıcı dizi küçük harf ile
10 gösterilmektedir.

Şekil 8, 17'nin amino asit dizisidir (SEQ ID NO: 16) ve AvrBs2 tanıma etki alanının bir yarı tandem tekrarlarını göstermektedir. 12 ve 13 pozisyonlarında hiper-değişken amino asitler kutu içinde gösterilmektedir.

15

Şekil 9, TAL etkililiğini test etmek için bir maya eşeyi için bir şemayı gösteren bir diyagramdır.

Şekil 10, AvrBs2 TAL nükleazının maya eşey sonuçlarını
20 gösteren bir grafikdir. Şekil 11, tek, çift veya üçlü AsvBs2 tkrar modülleri ve bir klonlama vektörünün bir şematik temsilini gösteren bir diyagramdır.

Şekil 12A ve 12B, bir tek temsili TAL efektörü tekrarını (Şekil
25 12A) ve aynı zamanda çoğu TAL efektöründe tekrar bölgesinin sonunda mevcut olan bir temsili tepesi kesik tekrarı (Şekil 12B) göstermektedir. Nükleotit ve kodlanmış amino asit dizileri gösterildiği şekildedir. Ns, "XX" olarak gösterilen RVDTeri kodlayan nükleotitleri temsil etmektedir. Sayılar amino asit
30 pozisyonlar için verilmiştir. Diziler talhc'den alınmıştır.

Şekil 13, tekrar bölgesinin bir tek, tepesi kesik tekrara indirildiği ve pCS487'nin sonuç alındığı proses ve talhc genini

gösteren bir şematiktir. M, MscI sahası; S, SphI sahası.

Şekil 14, pCS489'u verecek şekilde bir PspXI ve XhoI sahası oluşturmak için pCS487'de orijinal tepesi kesik tekrarın ucunda bir translasyonel olarak sessiz mutasyonun girişini gösteren bir şematiktir. Orijinal tekrardaki (SEQ TD No: 21) ve mutasyona uğrayan tekrardaki kodonların (18-21) dizileri gösterilmektedir. Kodlanan amino asit dizisi (SEQ ID No:22) mutasyon ile değiştirilmemiştir. Mutasyona uğrayan nükleotitler italik olarak yazılmıştır.

Şekil 15, pCS488'in bir haritasıdır ve Gateway giriş vektörü pENTR-D'de tekrar bölgesi olmaksızın sadece tallic'nin N ve C terminal kısımlarını kodlayan bir kanamisin dirençli plazmittir

Şekil 16, RVDNI'ye sahip bir tekrarı kodlayan, pCS493 olarak gösterilen bir tek tekrar başlatıcı plazmitinin bir haritasıdır. Kodladıkları RVDter hariç olmak üzere (sağda verilmiştir) pCS494, pCS495, ve pCS496 olarak gösterilen üç diğer plazmit aynıdır.

Şekil 17A, RVD NI ile bir tek tekrar modülü için nükleotit ve kodlanmış amino asit dizilerini göstermektedir. 5' XhoI uyumlu kohezif uç, MscI sahası ve 3' PspXI/XhoI uyumlu kohezif ucun altı çizilmiştir. RVD ve onu kodlayan nükleotitler koyu tiptedir. Sırasıyla HD, NI ve NG'yi kodlayan RVD kodlama dizileri hariç olmak üzere gösterilene benzer olan üç diğer tekrar modülü inşa edilmiştir. Şekil 17B, Şekil 17A'da gösterilen tekrar kodlama dizisini içeren, pCS502 olarak gösterilen tek tekrar modül plazmitinin bir haritasıdır. pCS503, pCS504, ve pCS505 olarak gösterilen plazmitler de üretilmiştir ve bunlar, kodladıkları RVD'ler hariç olmak üzere pCS502 ile aynıdır (sağda verilmiştir).

Şekil 18A, RVD NI'li bir tek tekrarmodülü için nükleotit ve kodlanan amino asit dizilerini göstermektedir ve burada nükleotit ikameleri (italik olarak verilen) PspXI/XhoI sahasına

ligasyondan sonra 5' uçta XhoI sahasının yeniden inşasını önlemekte ve dahili MscI sahasını imha etmektedir. RVD ve onu kodlayan nükleotitler koyu tiptedir. Sırasıyla HD, NT ve NG'yi kodlayan RVD kodlama dizileri hariç olmak üzere gösterilene benzer olan üç diğer tekrar modülü inşa edilmiştir. Şekil 18B, ilave tekrar modüllerini sıralı bir şekilde bir tek tekrar modül plazmitine bağlamak suretiyle monte edilen bir üç tekrar modlünün şematiğidir. Birinci tekrardaki MscI sahası ve 3' uçtaki PspXI sahası kendilerine özgün kalmaktadır ve bütün modül iki XhoI sahası ile desteklenmektedir. Şekil 19, bir, iki ve üç tekrarlı modül plazmitinin komple setinin bir listesidir. Şekil 20, bir özel TAL efektör geni oluşturmak üzere tallo "omurgasına" herhangi bir tekrarlar dizisini monte etmek için kullanılabilecek bir yöntemdeki adımları gösteren bir akış şemasıdır.

Şekil 21A ve 21B, gösterilen nükleotit dizilerini hedef alacak TAL endonükleazlarının yapımında tekrar modüllerinin montajını gösteren şematiktir. Şekil 21A'da, pCS519, pCS524, pCS537, pCS551, pCS583, ve pCS529 olarak gösterilen plazmitlerden alınan tekrar modülleri, pCS493 olarak gösterilen başlatıcı plazmitteki diziye sıralı bir şekilde ilave edilmiş ve pMAT55, pMAT56, pMAT57, pMAT58, pMAT59, ve pMAT60 olarak gösterilen plazmitler elde edilmiştir. Şekil 21B'de, pCS530, pCS533, pCS522, ve pCS541 olarak gösterilen plazmitlerden alınan tekrar modülleri, pMAT1 olarak gösterilen plazmitteki diziye sıralı bir şekilde ilave edilmiş ve pMAT61, pMAT62, pMAT63, ve pMAT64 olarak gösterilen plazmitler elde edilmiştir.

Şekil 22A, bir TAL efektör proteininin bir şematiğidir. BamTI fragmanları (B'lerle gösterilen) TALEN'leri elde etmek için FokI endonükleazın katalitik etki alanına kaynaştırılmıştır. N, N-terminus; NLS, nucleer lokalizasyon sinyali; B, BamHI sahası, AD, asidik aktivasyon etki alanı. Şekil 22B, TAL efektörleri AvrBs3 ve PthXol ile inşa edilen TALEN'lerin aktivitesini gösteren bir grafiktir. Avr-FokI, AvrBs3 TALEN; Pth-FokI, PthXoI TALEN, Avr-FokI ve Pth-FokI, AvrBs3 ve PthXol füzyonları,

FokI'in katalitik olarak inaktif versiyonuna (Bitiiraite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10570-10575); ZFN, çinko parmak nükleaz içeriğinde Zif268 DNA bağlanma etki alanı (Porteus and Baltimore (2003) Science 300:763). ŞEK 23 PthXol amino asit dizisinin (SEQ ID NO:31) bir referansıdır. ŞEK 24 PthXol nükleik asit dizisinin (SEQ ID NO:32) bir referansıdır. ŞEK 25 pFZ85 vektörünün bir diyagramıdır.

ŞEK 26 avrBs3_TALEN (SEQ ID NO:33)'in amino asit dizisini göstermektedir. ŞEK 27 pthXol_TALEN (SEQ ID NO:34)'in amino asit dizisini göstermektedir. Şekil 28A, farklı aralayıcı uzunluklarına sahip hedefler üzerinde AvrBs3 ve PthXol TALENS'in aktivitesini gösteren bir grafikdir. ZFN, Zif268'den türetilmiş çinko parmak nükleazı. Şekil 28B, bir heterodimerik TALEN'i aktivitesini gösteren bir grafikdir. PthXol-FokI ve AvrBs3-FokI ekspresyon vektörlerini ve her biri için tanıma sahalarından oluşan bir hedefli plazmiti içeren mayadaki aktivite, 15bp ile ayrılan baş-kuruk yönlü olarak gösterilmiştir (Avr-FokI, Pth-FokI). Ayrıca referans olarak bireysel olarak AvrBs3 (Avr-FokI) ve PthXol (Pth-FokI) TALENS ve Zif268 (ZFN) aktivitesi ilgili hedefler üzerinde olmak üzere gösterilmektedir. Bir negatif kontrol olarak, LacZ aktivitesi için Avr-FokI, Pth-FokI için hedef shaa plazmiti ile bir maya kültürü tahlil edilmiştir ((-) olarak gösterilmektedir.

Şekil 29A, bireysel özel TALEN'lerin RVD dizilerini ve bunların ilgili DNA tanıma dizilerini gösteren bir tablodur. Şekil 29B, Özel TALEN'lerin aktivitesini gösteren bir grafikdir, (i)sadece hedef saha plazmitleri ile negatif kontrol; ZFN, çinko parmak nükleaz pozitif kontrolü.

Şekil 30, 20 hedef ve TAL efektör çiftlerinin terminisinde nükleotit ve RVD frekanslarının bir gösterimidir. Şekil 31, Altın Kapı klonlama sisteminin bir şematiğidir (Engler ve ark. (2008) PLoS One 3:e3647; and Engler et al. (2009) PLoS One4:e5553],

Şekil 32A ve 32B, burada tarif edildiği şekilde Altın Kapı klonlama yaklaşımı kullanılarak özel TAL efektörü tekrar kodlama

dizilerinin klonlanması ve montaj için bir 58 plazmitlik seti göstermektedir. Tet, plazmit seçimi için bir markör olan tetrasiklin direnç geni; spec, plazmit seçimi için bir markör olan spektinomisin direnç geni; amp, plazmit seçimi için bir markör olan ampicilin direnç genidir. Şekil 33, Şekil 32’de gösterilen plazmitler seti kullanılarak Altın Kapı yaklaşımı ile özel TAL efektör tekrar kodlama dizilerinin klonlanması ve montaj için bir yöntemin bir şematiğidir.

Sadece örnek amacıyla, bir keyfi tekrar dizisinin montajı

gösterilmektedir, spec, plazmit seçimi için bir markör olan spektinomisin direnç geni; amp, plazmit seçimi için bir markör olan ampicilin direnç genidir

Şekil34A-34U, burada Örnek 9’da tarif edildiği şekilde üretilen TALENlerin amino asit dizilerini göstermektedir. ŞEK 34A, telomeraz-TALEN124; ŞEK 34B, gridlock-TALEN 105; ŞEK 34C, adhl-TALEN58; ŞEK 34D, adhl-TALEN63; ŞEK 34E, adhl-TALEN68; ŞEK 34F, adhl-TALEN73; ŞEK 34G, adhl- TALEN89; ŞEK 34H, gridlock-TALEN106; ŞEK 34I, adhl-TALEN64; ŞEK 34J, adhl-TALEN69; ŞEK 34K, adhl-TALEN74; ŞEK 34L, tt4-TALEN90; ŞEK 34M, tel-omerase-TALEN121; ŞEK 34N, telomerase-TALEN126; ŞEK 34O, gridlock-TALEN107; ŞEK 34P, gridlock-TALEN117; ŞEK 34Q, telomerase- TALEN 131; ŞEK 34R, telomerase-TALEN 136; ŞEK 34S, adhl-TALEN60; ŞEK 34T, tt4-TALEN85; ŞEK 34U, gridlock-TALEN 102.

Şekil 35, artan uzunlukta (9-, 10-, 12-, 13-, 15-, 16-, 17-, veya 18 mers) özel TALEN monomerleri kullandarak maya tahlili ile Ölçülen TALEN aktivitesini gösteren bir grafikdir. TALENler, gösterildiği şekilde Arabidopsis ve zebra balığı genlerine hedeflenmiştir.

Şekil 36A, iki TALEN çiftinin hedef aldığı Arabidopsis ADH1 geninden alınan iki farklı DNA hedef dizini gösteren bir diyagramdır. Şekil 36B, Arabidopsis ADH1 genini hedef alan işlevsel TALEN çiftleri için maya tahlil verilerini gösteren bir grafikdir.

Şekil 37A, Arabidopsis protoplastlarda TALEN'in neden olduğu mutasyonları tespit etmek için kullanılan bir kısıtlama endonükleaz tahlilinin bir şematiğidir. Şekil 37B, kısıtlama endonükleaz tahlilinde sindirilmemiş DNA'dan alınan dokuz klonun dizilerini göstermektedir. Klonlardan altı tanesi, homolog olmayan uç birleştirmenin (NHEJ) neden olduğu mutasyonlara sahiptir. Şekil 38A, AvrHahl Xanthomonas gardneri den, AvrBs3 X. campestris pv. Vesicatoria dan, PthXol X. oryzae pv. Oryzae den, PthA X. citri den, ve Talle X. oryzae pv. Oryzicola dan olmak üzere birden fazla filogenetik olarak ayrı TAL efektörlerinin O'uncu tekrar dizilerini göstermektedir. Polimorfik pozisyonlar kutulu olarak gösterilmiştir. Şekil 38B, PthXol'in O'uncu ve l'inci tekrarlarını gösteren bir şematiktir. O'uncu tekrar hemen l'inci tekrardan öncedir ve % 35 aynılık göstermektedir ve benzer bir tahmin edilen ikincil yapıya sahiptir, l'inci tekrarın RVD'si ve O'uncu tekrarın aday analog kalıntılarının altı çizilmektedir. *, gap; H, helix; E, uzatılmış. Yapı JPred kullanılarak tahmin edilmiştir (Cole et al. (2008) Nucl. Acids Res. 36:W197-W201).

Şekil 39, gösterildiği şekilde, fare-anti V5 antikoru kullanılarak imono-tespitten sonra, V5 etiketli TAL efektör proteinleri AvrBs3, PthXol, ve Tali c'yi kodlayan plazmitlerle transfekte edilmiş insane embriyotik böbrek(293T) hücrelerinden izole edilmiş toplam proteinin bir Wester blot'unu göstermektedir. İmüno-etiketli aktin, her bir şeritte denk yükleme için bir kontrol olarak gösterilmektedir. Şeki 40A, TALEN HPRT-3254-17'nin amino asit dizisini göstermektedir, ve Şeki 40B, TALEN HPRT-3286-20r'nin amino asit dizisini göstermektedir, ve Şekil 41 A, insan kromozomal HPRT geninde TALEN'in hedeflediği sahayı gösteren bir şematiktir. HPRT-3254-17 ve HPRT-3286-20r TALENler için bağlayıcı sahalar, bu sahalar arasındaki aralayıcıda Bpu 101 sahası ve bölgenin yükseltilmesi için primer sahalar gösterilmektedir. Tabandaki koordinatlar, kodlama dizisinin birinci nükleotitinden gelen baz çiftlerindeki mesafeyi vermektedir. Şekil 41B, şablon olarak

TALEN ile işlenmiş ve işlenmemiş hücrelerden izole edilen genomik DNA kullanılarak Şekil 41A'da gösterilen bölgenin PCR amplifikasyonunun ürünlerinin Bpu10I sindiriminin sonuçlarını göstermektedir. Genomik DNA, amplifikasyondan önce Bpu 101 ile
5 sindirilmiştir. DNA fragmanları, agaroz jel elektroforezi ile ayrılmış ve etidyum bromit kullanılarak görselleştirilmiştir.

BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Mevcut patent başvurusu, TAL efektörlerinin aracılık ettiği diziye özgü DNA tanınması ile ilişkili yöntemler ve malzemeleri
10 sağlamaktadır. Burada tarif edildiği şekilde, TAL efektörlerinin primer amino asit dizileri, bağlandıkları nükleotit dizilerini belirlemektedir. Buluş sahipleri şunu tespit etmiştir ki TAL efektör amino asit dizileri ve bunların
15 DNA hedef dizileri arasındaki ilişki doğrudandır ve bu TAL efektörleri için hedef saha tahminine izin vermektedir ve aynı zamanda TAL efektör özelleştirmesinin özel nükleotit dizilerine bağlanmasına izin vermektedir. Bu tahmin ve özelleştirme, farklı amaçlarla desteklenebilmektedir. Bir örnekte, özel TAL efektör
20 dizileri, endonükleaz dizileri ile kaynaştırılabilir ve bu spesifik DNA dizilerine endonükleaz hedeflemeye ve daha sonra hedeflenen dizilerde veya yakınında DNA'nın kesilmesine izin verecektir, DNA'daki kesimler (yani çift iplikli kopmalar) dramatik olarak homolog rekombinasyon sıklığını artırmaktadır.
25 Böylelikle, bir özel hedef DNA dizisine yüksek derecede bir dizi benzerliğine sahip dizileri taşıyan DNA konstrüktleri ile birlikte, TALEN'ler karmaşık genomlarda sahaya yönlendirilmiş mutagenezi kolaylaştırmak, yani gen fonksiyonunu yok etmek veya değiştirmek veya yüksek hassasiyet ve yüksek etkililiğe sahip
30 genler veya diğer diziler ilave etmek için kullanılabilir.

Bu nedenle, burada belirtilmiş olan konu dahilinde, diğerlerinin yanında, genetik olarak modifiye edilmiş organizmalar hazırlamak için malzemeler ve yöntemler yer
almaktadır (buna, sınırlama olmaksızın, bitkiler, mantarlar,
35 Droshila, nematotlar, zebra balığı, fare, diğer memeliler ve

insanlar dahildir). Bu yöntemler örneğin bir hücrenin birden fazla rekombinant nükleik asit ile transfekte edilmesini içerebilir. Örneğin, bir hücre (ör. bi rökaryotik hücre) hücre içinde bulunan bir karşılık gelen hedef nükleotit dizisine göre
5 aberasyonlar içeren bir donör nükleotit dizisini içeren bir birinci rekombinant nükleik asit ile ve bir TAL nükleazı kodlayan bir ikinci rekombinant nükleik asit konstrüktü ile dönüştürülebilir. Bazı yapılandırmalarda, hücre aynı zamanda bir seçilebilir markör kodlayan bir üçüncü rekombinant nükleik
10 asit konstrüktü ile dönüştürülebilir. Donör nükleik asit konstrüktünden bir nükleik asit dizisi, burada tarif edildiği şekilde dönüştürülen hücrenin genomuna dahil edilebilir. Örneğin, burada tarif edilmiş olan yöntemler kullanılarak üretilen bitki hücreleri, genomlara dahil edilen değiştirilmiş
15 donör nükleit dizisine sahip bitkileri üretecek şekilde yetiştirilebilir. Bu bitkilerden tohumlar, örneğin değiştirilmemiş bitkilere göre bir değiştirilmiş büyüme özelliği (ör. farklı biyotik ve abiyotik streslere karşı artan direnç veya tolerans), değiştirilmiş görünüm (ör. değiştirilmiş
20 renk veya yükseklik) veya değiştirilmiş bileşim (ör. artan veya azalan karbon, nitrojen, yağ, protein, karbonhidrat (ör. şeker veya nişasta) amino asit, yağ asidi veya sekonder metabolitler düzeyi)sahibi bitkileri üretecek şekilde kullanılabilir.

Polinükleotitler ve Poîipeptitler

25 İzole edilmiş nükleik asitler ve poîipeptitler burada sağlanmıştır. "Nükleik asit" ve "polinükleotit" terimleri burada birbiri yerine kullanılabilir ve cDNA, genomik DNA, sentetik (ör. kimyasal olarak sentezlenmiş) DNA veya nükleik asit analoglarını içeren DNA (veya RNA) ifade edecek şekilde
30 kullanılır. Polinükleotitler herhangi bir üç boyutlu yapıya sahip olabilir. Bir nükleik asit, çift iplikli veya tek iplikli (yani bir sens ipliği veya bir anti-sens tek iplik) olabilir. Polinükleotitlerin sınırlandırıcı olmayan örnekleri arasında genler, gen fragmanları, egzonlar, intronlar, mesajcı RNA
35 (mRNA), transfer RNA, ribozomal RNA, ribozimler, cDNA,

rekombinant polinükleotitler, dallı polinükleotitler, plazmitler, vektörler, herhangi bir diziden izole edilmiş DNA, herhangi bir diziden izole edilmiş RNA, nükleik asit problemleri ve primerler ve aynı zamanda nükleik asit analogları

5 yer almaktadır.

Mevcut buluşun polipeptitleri (Örneğin sınırlandırıcı olmayan örnek olarak TAL efektörü DNA modifiye eden enzimi) sonoporasyon veya elektroporasyon veya bu tekniklerin türevleri gibi herhangi bir hücresel permeabilizasyonla ilişkili veya birleştirilmiş

10 aktarım vektörleri kullanılmak suretiyle polipeptitler olarak veya örneğin söz konusu polipeptitleri kodlayan bir vektör kullanarak bir hücreye dahil edilebilir.

Burada kullanımı itibarıyla, "izole edilmiş", bir nükleik aside referansla kullanıldığında, genomdaki nükleik asidin bir veya

15 her iki tasarında normal olarak destek sağlayan nükleik asitler dahil olmak üzere, örneğin bir bitki genomu gibi bir genomda mevcut olan diğer nükleik asitlerden ayrılır. Burada nükleik asitlere ilişkin olarak kullanılmış olan "izole edilmiş" terimi, herhangi bir normal olarak oluşmayan diziyi içermektedir, çünkü

20 söz konusu doğal olarak oluşan diziler doğada bulunmamaktadır ve doğal olarak oluşan bir genomda hemen bulaşıcı dizilere sahip değildir.

Bir izole edilmiş nükleik asit örneğin bir DNA molekülü olabilir, ancak bir doğal olarak oluşan genomda söz konusu DNA

25 molekülüne hemen bitişik olarak normalde bulunan nükleik asit dizilerinden biri çıkartılmalı veya mevcut olmamalıdır. Böylelikle, bir izole edilmiş nükleik asit, sınırlama olmaksızın, diğer dizilerden bağımsız olarak bir ayrı molekül olarak mevcut bir DNA molekülünü (ör. bir kimyasal olarak

30 sentezlene nükleik asit, veya PCR veya kısıtlama endonükleaz işlemi ile üretilen bir cDNA veya genomik DNA fragmanı), veya bir vektöre, bir otonom olarak replika olan plazmite, bir virüse (bir pararetrovirüse, bir retrovirüse, lentivirüse, adenovirüse veya aherpes virüsüne) dahil edilen bir DNA veya bir prokaryot

35 veya ökaryotun genomik DNA'sim içermektedir. Buna ek olarak,

bir izole edilmiş nükleik asit, bir hibrit veya füzyon nükleik asitinin bir parçası olan bir DNA molekülü gibi bir rekombinant nükleik asit içerebilir. Bir genomik DNA restriksiyon digesti içeren jel dilimleri, veya cDNA kütüphaneleri veya genomik kütüphaneler dahilinde diğer nükleik asitlerden yüzlercesi ile milyonlarcası arasında mevcut bir nükleik sit, bir izole edilmiş nükleik asit olarak değerlendirilmez.

Bir nükleik asit, örneğin kimyasal sentez veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile yapılabilir. PCR, hedef nükleik asitlerin amplifiye edildiği bir prosedür veya tekniği ifade etmektedir. PCR toplam genomik DNA veya toplam hücrel RNA'dan alınan diziler dahil olmak üzere, DNA ve RNA'dan alınan spesifik dizileri amplifiye etmek için kullanılabilir. Farklı PCR yöntemleri örneğin PCR Primer: A Laboratory Manual, Dieffenbach and Dveksler, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995'te tarif edilmiştir. Genel olarak, ilgili bölgenin uçlarından veya ötesinden alınan dizi bilgileri amplifiye edilecek şablonun karşıt dizilerine sıra olarak aynı veya benzer olan oligonükleotit primerleri tasarlamak için kullanılır. Bir şablon nükleik aside sahaya özgü nükleotit dizi modifikasyonlarının dahil edilmesi için farklı PCR stratejileri bulunmaktadır.

İzole edilmiş nükleik asitler aynı zamanda mutagenез ile elde edilebilir. Örneğin, oligonükleotit yönlendirmeli mutagenез ve PCR içinden sahaya yönlendirmeli mutagenез dahil standart teknikler kullanılarak bir donör nükleik asit dizisi mutasyona uğratılabilir. Bkz. Short Protocols in Molecular Biology, Chapter 8, Green Publishing Associates and John Wiley & Sons, edited by Ausubel et al., 1992.

Burada kullanıldığı itibarla "polipeptit" terimi, post-translasyonel modifikasyona bakılmaksızın iki veya daha fazla alt birim amino asidinin bir bileşenini ifade etmektedir (ör. fosforilasyon veya glikosilasyon) Alt birimler peptit bağlarla veya örneğin ester veya eter bağları gibi diğer bağlarla bağlanabilir. "Amino asit" terimi, D/L optik izomerleri dahil

olmak üzere doğal ve/veya doğal olmayan veya sentetik amino asitleri ifade etmektedir.

Bir polipeptite ilişkin olarak "izole edilmiş" veya "saflaştırılmış" ifadesi ile anlatılmak istenen, polipeptitin, normal olarak doğada bulunduğu hücresel bileşenlerden belli ölçüde ayrılmasıdır (ör. diğer polipeptitler lipitler, karbonhidratlar veya nükleik asitler). Bir saflaştırılmış polipeptit bir indirgemesiz poliakrilamit jel üzerinde bir tek ana bant verebilir. Bir saflaştırılmış polipeptit en az yaklaşık % 75 saf (ör. en az 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, veya 100% saf) olabilir. Saflaştırılmış polipeptitler örneğin bir barındırıcı hücrede veya transgenik bitkide rekombinant üretim veya kimyasal sentez ile bir doğal kaynaktan ekstrasyon ile elde edilebilir ve örneğin afinite kromatografisi, imünopresipitasyon, boyut eksklüzyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılabilir. Saflaştırmanın boyutu, sınırlama olmaksızın kolon kromatografisi, poliakrilamit jel elektroforezi veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi dahil herhangi bir uygun yöntem kullanılarak ölçülebilir.

Rekombinant Konstrüktler

Rekombinant nükleik asit konstrüktleri (ör. vektörleri) de burada sağlanmaktadır. Bir "vektör" bir plazmit, faj veya kozmit gibi bir relikondur ve buna, eklenen segmentin replikasyonunu sağlamak için diğer bir DNA segmenti eklenebilir. Genel olarak, bir vektör, uygun kontrol elemanları ile ilişkilendirildiğinde replikasyon kapasitesine sahiptir. Uygun vektör omurgaları arsında, örneğin plazmitler, virüsler, yapay kromozomlar, BAC'lar, YAC'lar veya PAC'lar gibi teknikte rutin olarak kullanılanları içermektedir. "Vektör" terimi, klonlama ve ekspresyon vektörlerini ve aynı zamanda viral vektörleri ve entegre eden vektörleri içermektedir. Bir "ekspresyon vektörü", bir veya daha fazla ekspresyon kontrol dizisi içeren bir

vektördür ve bir "ekspresyon kontrol dizisi", diğer DNA dizisinin transkripsiyon ve/veya translasyonunu kontrol eden veya düzenleyen bir DNA dizisidir. Uygun ekspresyon vektörleri arasında, sınırlama olmaksızın, örneğin bakteriyofaj, bakulovirüsler, tütün mozaik virüsü, herpes virüsleri, sitomegalovirüs, retrovirüsler, vaccinia virüsleri, adenovirüsler ve adeno ilişkili virüslerden türetilen plazmitler ve viral vektörler yer almaktadır. Bir çok vektör ve ekspresyon sistemi Novagen (Madison, WI), Clontech (Palo Alto, CA), Stratagene (La Jolla, CA), ve Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA) gibi şirketlerden ticari olarak bulunabilmektedir.

"Düzenleyici bölge" "kontrol elemanı" ve "ekspresyon kontrol dizisi" terimleri, transkripsiyon veya translasyon başlatma ve oranını ve transkript veya polipeptit ürünün stabilitesi ve/veya mobilitesini ifade etmektedir. Düzenleyici bölgeler arasında, sınırlama olmaksızın, promotör dizileri, geliştirici dizileri, cevap elemanları, protein tanıma sahaları, endüke edilebilir elemanlar, promotör kontrol elemanları, protein bağlanma dizileri, 5' ve 3' çevrilmemiş bölgeler (UTR'ler), transkripsiyonel başlama sahaları, temrinasyon dizileri, poliadenilasyon dizileri, intronlar ve sekretör sinyaller, Nükleer Lokalizasyon Dizileri (NLS) ve proteaz klevaj sahaları gibi kodlama dizileri içinde yer alan diğer düzenleyici bölgeler yer almaktadır.

Burada kullanımı itibariyle, "işler olarak bağlantılı" ifadesi, bir genetik konstrükte dahil edilmiş anlamına gelmektedir, öyle ki ekspresyon kontrol dizileri, ilgili bir kodlama dizisinin ekspresyonunu etkili bir şekilde kontrol edebilmektedir. RNA polimerazı, bir mRNA olması durumunda, kodlama dizisi tarafından kodlana proteine dönüştürülebilecek RNA'ya kodlama dizisini transkribe edebildiği zaman bir kodlama dizisi bir hücredeki ekspresyon kontrol dizilerinin "kontrolü altındadır" ve bunlarla "işlevsel olarak bağlantılıdır". Böylelikle, bir

düzenleyici bölge, bir modifiye edilmiş hedef nükleik asidi eksprese etmenin arzu edildiği bitki hücresi, bitki veya bitki dokusunda transkripsiyonu modüle edebilir, örneğin düzenleyebilir, kolaylaştırabilir veya yönlendirebilir.

- 5 Bir promotör, tipik transkripsiyonun başladığı noktanın üst akışındaki 100 nükleoti dahilinde olmak üzere bir DNA molekülünün bir bölgesinden oluşan bir ekspresyon kontrol dizisidir(genellikle RNA polimeraz IT için başlangıç sahasının yakınında), Promotörler, transkripsiyonu başlatmak ve modüle etmek için RNA polimeraz ve diğer proteinlerin tanınması ve bağlanmasına dahildir. Bir kodlama dizisini bir promotörün kontrolü altına getirmek için, tipik olarak promotörün aşağı akışında bir ve yaklaşık elli nükleotit arasında polipeptitin translasyon okuma freyminin translasyon başlatma sahasına konumlandırmak gerekmektedir. Ancak bir promotör, translasyon başlangıç sahasının aşağı akışında yaklaşık 5,000 nükleotit olacak şekilde, veya transkripsiyon başlangıç sahasının yukarı akışında yaklaşık 2,000 nükleotit olacak şekilde konumlandırılabilir. Bir promotör tipik olarak en az bir çekirdek (bazal) promotörden oluşur. Bir promotör aynı zamanda bir yukarı akış elemanı gibi en az bir kontrol elemanı içerebilir. Bu elemanlar yukarı akış aktivasyon bölgelerini (UAR'ler) ve opsiyonel olarak bir sentetik yukarı akış elemanı gibi bir polinükleotitin transkripsiyonunu etkileyen diğer DNA dizilerini içerir.

- 25 Dahil edilecek promotörlerin seçimi, sınırlama olmaksızın etkililik, seçilebilirlik, endüke edilebilirlik, istenilen ekspresyon düzeyi ve hücre veya doku spesifikliği dahil olmak üzere bir çok faktöre bağlıdır. Örneğin, transkripsiyonu sadece veya baskın olarak sırasıyla özel bir doku, organ veya hücre tipine veren dokuya, organa ve hücreye özgü promotörler kullanılabilir. Bazı yapılandırmalarda, sap, parenşima, toprak meristem, vasküler demet, kambiyum, floem, korteks, skoot apikal meristem, lateral shoot meristem, kök apikal meristem, lateral kök meristem, yaprak primordium, yaprak mezofil, veya yaprak

- epidermis gibi bitkisel dokulara spesifik promotörler uygun düzenleyici bölgeler olabilir. Bazı yapılandırmalarda, tohumlara spesifik olarak promotörler ("tohum-tercihi i promotörler") faydalı olabilir. Tohuma özgü promotörler, tohum gelişimi sırasında endosperm ve kotiledon dokusunda işlevsel olarak bağlı nükleik asidin transkripsiyonunu destekleyebilir. Alternatif olarak, yapıcı promotörler, bitki geliştirmesi yoluyla bir bitkinin çoğu veya tüm dokularında işlevsel olarak bağlı nükleik asidin transkripsiyonunu destekleyebilir.
- 5 Promotörlerin diğer sınıfları arasında, sınırlama olmaksızın, kimyasal ajanlar, gelişimsel uyarıcılar veya çevresel uyarıcılar gibi harici uyarıcılara cevap olarak transkripsiyon sağlayan promotörler gibi endüke edilebilir promotörler yer almaktadır.
- 10 Bir bazal promotör, transkripsiyonun başlaması için gerekli bir transkripsiyon kompleksinin montajı için gerekli asgari dizidir. Bazal promotörler genellikle transkripsiyonun başlama sahasından yukarı akışta yaklaşık 12 ve yaklaşık 35 nükleotit arasında yerleştirilmiş olabilecek bir "TATA kutu" elemanı
- 15 içermektedir. Bazal promotörler aynı zamanda bir CCAAT kutu elemanını (tipik olarak CCAAT dizisi) ve/veya bir GGGCG dizisini içerebilir ki bu, yaklaşık 40 ve yaklaşık 200 nükleotit arasında, tipik olarak 60 ila yaklaşık 120 nükleotit arasında, transkripsiyon başlama alanının yukarı akışında yer alır.
- 20 Burada verilmiş olannükleik asit konstrüktlerine dahil edilebilecek promotörlerin sınırlandırıcı olmayan örnekleri arasında karnabakar mozaik virüsü (CaMV) 35S transkripsiyon başlatma bölgesi, Agrobacterium tumefaciens'in T-DNA'sından türetilen 1' veya 2' promotörler, Busk ((1997) Plant J. 11:1285-
- 25 1295) tarafından tarif edilen bir mısır yaprağa özgü genden elde edilen promotörler, mısır ve diğer türlerden elde edilen knl- ile ilişkili genler ve mısır ubikutin-1 promotörü gibi farklı bitki genlerinden alman transkripsiyon başlatma bölgeleri yer almaktadır.
- 30 Bir 5' çevrilmemiş bölge (UTR) transkribe edilmektedir ancak
- 35

çevrilmemektedir ve transkript ve translasyon başlama kodonunun başlama sahası arasında yer alabilmekte ve +1 nükleotit içerebilmektedir. Bir 3' UTR, translasyon terminasyon kodonu ve transkriptin ucu arasında konumlandırılabilmektedir. UTR'ler, mRNA mesaj stabilitesinin veya translasyon atenüasyonunun artırılması gibi özel fonksiyonlara sahip olabilir. 3' UTR'lerin örnekleri arasında, sınırlama olmaksızın, poliadenilasyon sinyalleri ve transkripsiyon terminasyon dizileri yer almaktadır. Bir kodlama bölgesinin 3' ucundaki bir poliadenilasyon bölgesi, bir kodlama dizisine işlevsel olarak bağlanabilir. Poliadenilasyon bölgesi, doğal genden, farklı diğer bitki genlerinden veya bir Agrobacterium T-DNA'dan türetilir.

Burada sağlanan vektörler aynı zamanda örneğin replikasyon ve/veya iskele ekleme bölgelerinin orijinlerini içerebilir. Buna ek olarak, bir ekspresyon vektörü, eksprese edilen polipeptitin manipülasyonu veya tespitini (ör. saflaştırma veya lokalizasyon) kolaylaştıracak şekilde tasarlanmış bir etiket dizisi içerebilir. Yeşil florasan proteini (GFP), glutathion S-transferaz (GST), polihistidin, c-myc, hemagglutinin, veya Flag™ etiketi (Kodak, New Haven, CT) dizileri gibi etiket dizileri tipik olarak kodlanmış polipeptit ile bir füzyon olarak ifade edilir. Bu etiketler, karboksil veya amino terminus dahil olmak üzere polipeptit içinde herhangi bir yere sokulabilir.

"Aktarım vektörü" veya "aktarım vektörleri" ifadesi ile kastedilen, mevcut buluşta ihtiyaç duyulan ajanları /kimyasalları ve molekülleri hücre temasına koymak veya hücrelere veya alt hücresel kompartmanlara aktarmak için kullanılabilecek herhangi bir aktarım vektörüdür. Bu, sınırlama olmaksızın, lipozomal aktarım vektörlerini, viral aktarım vektörlerini, ilaç aktarım vektörlerini, kimyasal taşıyıcıları, polimerik taşıyıcıları, lipopleksleri, polipleksleri, dendrimerleri, mikro kabarcıkları (ultrason kontrast ajanları), nano partikülleri, emülsiyonları veya diğer uygun transfer vektörlerini içermektedir. Bu aktarım vektörleri, Diatos

tarafından geliştirilen plazmitler ve peptitler gibi moleküllerin, kimyasalların, makro moleküllerin (genler, proteinler) veya diğer vektörlerin aktarılmasına izin vermektedir. Bu durumlarda, aktarım vektörleri molekül taşıyıcılarıdır. "Aktarım vektörü" veya "aktarım vektörleri" ile kastedilen aynı zamanda transfeksiyonu gerçekleştirmek için amaçlanan aktarım yöntemleridir.

"Vektör" veya "vektörler" terimleri, bağlantılı bulunduğu diğer nükleik aside taşıma kapasitesine sahip bir nükleik asit molekülünü ifade etmektedir. Mevcut buluşta bir "vektör" sınırlama olmaksızın, bir kromozomal, kromozomal olmayan, yarı sentetik veya sentetik nükleik asitlerden oluşabilecek bir viral vektör, bir plazmit, bir RNA vektörü veya bir lineer veya dairesel DNA veya RNA molekülünü içermektedir. Tercih edilen vektörler, bağlantılı bulundukları nükleik asitlerin ekspresyonu ve/veya otonom replikasyon (epizomal vektör) kabiliyetine sahip olanlardır. Teknikte uzman olan kişiler çok fazla uygun vektörü bilmektedir ve bunlar ticari olarak bulunmaktadır.

Viral virüsler arasında, retrovirus, adenovirus, parvovirus (ör. Adeno ilişkili virüsler), koronavirüs, negative iplik RNA virüsleri, örneğin orthomyxovirus (ör. Grip virüsü), rhabdovirus (ör. Kuduz ve vesiküler virüsü), paramyxovirus (ör. Kızamık ve Sendai), pozitif iplikçikli RNA virüsleri örneğin picomavirus ve alphavirus, ve çift iplikçikli DNA virüsleri örneğin adenovirus, herpesvirus (ör. Herpes Simplex virüs tip 1 ve 2, Epstein-Barr virüsü, cytomegalovirus), ve poxvirus (ör. vaccinia, fowlpox ve canarypox) yer alır. Diğer virüsler arasında örneğin Norwalk virüsü, togavirüs, flavivirüsü, reovirüsleri, papovavirüsü, hepadnavirüsü ve hepatit virüsü yer alır. Retrovirüslerin örnekleri arasında şunlar yer alır: avian leukosis-sarcoma, memeli C-tipi, B-tipi virüsler, D tipi virüsler, HTLV-BLV grubu, lentivirus, spu-mavirus (Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, Third Edition, B. N. Fields, et al., Eds.,

Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

"Lentiviral vektör" ile kastedilen göreceli olarak büyük paketleme kapasiteleri, azaltılmış imünogenisite ve farklı bir çok hücre tipini yüksek etkililikle stabil bir şekilde transdüse etme kabiliyetleri nedeniyle gen aktarımı için çok ümit verici olan HIV tabanlı lentivirüs vektörleridir. Lentiviral vektörler genellikle üç (paketleme, zarf ve transfer) veya daha fazla plazmitin üretici hücrelere geçici transfeksiyondan sonra üretilmektedir. HIV gibi, lentiviral vektörler hedef hücreye viral yüzey reseptörlerinin hücre yüzeyi üzerindeki reseptörler ile etkileşimi yoluyla girmektedir. Girişten sonra viral RNA ters transkripsiyona tabi olur ki buna, viral ters kriptaz kompleksi aracılık eder. Ters transkripsiyonun ürünü bir çift iplikli lineer viral DNA'dır ve bu enfekte hücrelerin DNA'sında viral entegrasyon için substrattır. Söz konusu lentiviral vektörler "integratif olmayan" veya "integratif" olabilir.

- "İntegratif lentiviral vektörleri" (veya LV) ile kastedilen, sınırlayıcı olmayan bir örnek olarak bir hedef hücrenin genomunu entegre edebilecek vektörlerdir.

- Bunun aksine, "integratif olmayan lentiviral vektörleri" (veya NILV) ile kastedilen, virüs integrasyonunun eylemi aracılığıyla bir hedef hücrenin genomuna entegre olmayan etkili gen aktarım vektörleridir.

Tercih edilen bir vektör tipi bir epizomdur, yani ekstra kromozomal replikasyon kapasitesine sahip bir nükleik asittir. Tercih edilen vektörler, bağlantılı bulundukları nükleik asitlerin ekspresyonu ve/veya otonom replikasyon kabiliyetine sahip olanlardır. Operatif olarak bağlantılı olgukları genlerin ekspresyonunu yönlendirme kapasitesine sahip olan vektörlere burada "ekspresyon vektörleri" adı verilmektedir. Mevcut buluşa göre bir vektör, sınırlama olmaksızın, bir YAC (yapay kromozomu), bir BAC (bakteriyal yapay), bir bakulovirüs vektörü, bir faj, bir fajemit, bir kozmit, bir viral vektör, bir plazmit, bir RNA vektörü veya bir lineer veya dairesel DNA veya RNA molekülünden oluşur ki bu da kromozomal, kromozomal olmayan,

yarı sentetik veya sentetik DNA'dan oluşabilir. Genel olarak, rekombinant DNA tekniklerinde kullanılan ekspresyon vektörleri genellikle "plazmitler" formundadır ki bu da genellikle vektör formlarında kromozoma bağlanmayan dairesel çift iplikli DNA ilmeklerini ifade etmektedir. Teknikte uzman olanlar tarafından çok sayıda uygun vektör bilinmektedir. Vektörler, uygun markörlerden oluşabilir, örneğin: Ökaryotik hücre kültürü için neomisin fosfotransferaz, histidinol dehidrogenaz, dihidrofolat redüktaz, higromisin fosfotransferaz, herpes simpleks virüsü timidin kinaz, adenosin deaminaz, glutamin sentetaz ve hipoksin guanin fosforibosil transferaz; *S.cerevisiae* için TRP1; *E.coli*'de tetrasiklin, rifampisin veya ampicilin direnci. Tercihan söz konusu vektörler ekspresyon vektörleridir ve burada ilgili bir polipeptiti kodlayan bir dizi uygun transkripsiyonel ve translasyonel kontrol elemanlarının kontrolü altına yerleştirilerek söz konusu polipeptitin üretimi veya sentezine izin verilir. Bu nedenle, söz konusu polinükleotit bir ekspresyon kasetinden oluşmaktadır. Daha özel olarak, vektör bir replikasyon orijininin, söz konusu kodlayan polinükleotide işlevsel olarak bağlanmış bir promotör, bir ribozom bağlanma sahası, bir RNA ayırma sahası (genomik DNA kullanıldığında), bir poliadenilasyon sahası ve bir transkripsiyon terminasyon sahasından oluşur. Bu aynı zamanda bir geliştirici veya susturucu elemanlardan oluşabilir. Promotörün seçimi, polipeptitin eksprese edildiği hücreye bağlı olacaktır. Uygun promotörler arasında, dokuya özgü ve/veya endüke edilebilir promotörler yer almaktadır. Endüke edilebilir promotörlerin örnekleri şunlardır: Ağır metallerin artırılan düzeylerinin endüke ettiği ökaryotik metalotionin promotörü, izopropil-B-D-tiagalakto-piranosit (IPTG) e cevap olarak endüke edilen prokaryotik lacZ promotörü, ve artırılan sıcaklığın endüke ettiği ökaryotik ısı şoku promotörü. Dokuya özgü promotörlerin örnekleri arasında iskelet kas kreatin kinazı, prostata özgü antijen (PSA), α -antitripsin proetaz, insan sürfaktan (SP) A ve B proteinleri, B-kazein ve asidik peynir altı suyu protei

genleri yer almaktadır.

Endüke edilebilir promotörler, patojenler veya stresle, daha tercihen soğuk, ısı, UV ışığı veya yüksek iyonik konsantrasyonlarla endüke edilebilir, (değerlendirme için

5 Potenza et al (2004) In vitro Celi Dev Biol 40:1-22). Endüke edilebilir promotör kimyasallarla endüke edilebilir, [değerlendirme için Moore et al. (2006); Padidam (2003); (Wang et al. (2003); ve (Zuo ve Chua (2000)]. Aktarım vektörleri ve vektörler, sonoporasyon veya elektroporasyon veya bu
10 tekniklerin türevleri gibi herhangi bir hücrel permeabilizasyon tekniği ile ilişilendirilebilir veya birleştirilebilir.

Şurası anlaşılabilircektir ki bir rekombinant polinükleotitte birden fazla düzenleyici bölge mevcut olabilir - ör. intronlar,
15 geliştirciler, yukarı akış aktivasyon bölgeleri ve endüke edilebilir elemanlar.

Rekombinant nükleik asit konstrüktleri, hücrelerin dönüştürülmesi için uygun bir vektöre sokulan bir polinükleotit dizisini içerebilir (ör. bitki hücreleri veya hayvan hücreleri).

20 Rekombinant vektörler örneğin standart rekombinant DNA teknikleri kullanılarak yapılabilir (bkz. ör. Sambrook ve ark. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

25 Burada tarif edilmiş olan bir rekombinant nükleik asit dizisi, meşru olmayan rekombinasyon (yani rastgele, homolog olmayan, sahaya özgü olmayan) bir hücrenin genomuna entegre edilebilir veya burada tarif edildiği şekilde bir rekombinant nükleik asit dizisi, homolog rekombinasyon aracılığıyla bir hücrenin genouna
30 entegre edilecek şekilde uyarlanabilir. Homolog rekombinasyon aracılığıyla entegrasyon için uyarlanmış olan nükleik asit dizileri, endogenöz hedef nükleotit dizilerine aynı veya benzer olan dizilerle her iki kenardan desteklenir ve bu, endogenöz hedef nükleotit dizilerini içeren genomdaki özel sahalarda
35 rekombinant nükleik asidin entegrasyonunu kolaylaştırır.

Homolog rekombinasyon aracılığıyla entegrasyon için uyarlanan nükleik asit dizileri aynı zamanda bir diziye özgü nükleaz için bir tanıma sahası içerebilir. Alternatif olarak, bir diziye özgü nükleaz içintanıma sahası, dönüştürülecek olan hücrenin genomuna yerleştirilebilir. Aşağıda tarif edilmiş olan donör nükleik asit dizileri tipik olarak homolog rekombinasyon aracılığıyla entegrasyon için uyarlanır.

Bazı yapılandırmalarda, bir seçilebilir markörü kodlayan bir nükleik asit, homolog rekombinasyon aracılığıyla entegre olacak şekilde uyarlanabilir, ve böylelikle bitki genomu içindeki endogenöz diziler ile aynı veya bunlara benzer olan diziler ile her iki tarafta desteklenebilir (ör. bir diziye özgü nükleaz için klevaj alanında endogenöz diziler). Bazı durumlarda, bir seçilebilir markör için kodlama dizisini içeren nükleik asit bir diziye özgü nükleaz için bir tanıma sahasını içerebilir. Bu yapılandırmalarda, diziye özgü nükleaz için tanıma sahası, donör nükleik asit dizisi içinde yer alan ile aynı veya bundan farklı olabilir (yani, donör nükleik asit dizisi ile aynı nükleaz ile tanınabilir, veya donör nükleik asit dizisinden farklı nükleaz tarafından tanınabilir).

Bazı durumlarda, bir rekombinant nükleik asit dizisi, sahaya özgü rekombinasyon aracılığıyla bir hücrenin genomuna entegre edilecek şekilde uyarlanabilir. Burada kullanımı itibariyle, "sahaya özgü" rekombinasyon , rekombinant nükleik asitteki diziler ve genomdaki diziler arasındaki homoloji ile değil, ancak spesifik nükleik asit dizilerini tanıyan ve bu sahalar arasındaki DNA ipliklerinin karşılıklı alışverişini katalize eden rekombinaz enzimlerinin eylemi ile bir genom içinde bir özel sahaya bir nükleik asit dizisi hedeflendiği zaman gerçekleşen rekombinasyonu ifade etmektedir. Sahaya özgü rekombinasyon bu nedenle iki tanımlanan nükleotit dizisinin enzim aracılı birleşmesi ve ayrılmasını ifade etmektedir. Örneğin Cre-lox sistemi veya FLP-FRT sistemi dahil olmak üzere herhangi bir uygun saya özgü rekombinasyon sistemi kullanılabilir. Bu tür yapılandırmalarda, bir rekombinaz

enzimini kodlayan bir nükleik asit, bir donör nükleotit dizisine ve bir nükleaz kodlayan diziye ve bazı durumlarda bir seçilebilir markör dizisine ek olarak bir hücreye dahil edilebilir. Bkz. ör., U.S. Patent No. 4,959,317.

5 *Diziye özgü endonükleazlar*

Diziye özgü nükleazlar ve diziye özgü endonükleazları kodlayan rekombinant nükleik asitler burada sağlanmaktadır. Diziye özgü endonükleaz, TAL efektör DNA bağlanma etki alanları ve endonükleaz etki alanlarını içerebilir. Böylelikle, bu diziye özgü endonükleazları kodlayan nükleik asitler, bir nükleazdan bir nükleotit dizisine bağlanmış bir diziye özgü TAL efektöründen gelen bir nükleotit dizisini içerebilir. TAL efektörleri, bitki hücrelerine patojen ile enjekte edilen bitki patojenik bakterilerinin proteinleridir ve bunlar orada çekirdeğe hareket etmekte ve spesifik bitki genlerini değiştirmek için transkripsiyon faktörleri olarak işlev görmektedir. Bir TAL efektörünün primer amino asit dizisi, bağlı olduğu nükleotit dizisini belirlemektedir. Bu nedenle, hedef sahalar TAL efektörleri için tahmin edilebilir ve TAL efektörleri aynı zamanda burada tarif edildiği şekilde özel nükleotit dizilerine bağlanma amacıyla tasarlanabilir ve üretilebilir.

TAL efektörü kodlayan nükleik asit dizilerine kaynaştırılmış olarak, bir nükleazı veya bir nükleazın bir kısmını kodlayan diziler, tipik olarak FokI (Kim et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:1156-1160) yayınındaki gibi bir tip II restriksiyon endonükleazından alınan spesifik olmayan klevaj etki alanı kodlayan dizilerdir. Diğer kullanışlı endonükleazlar örneğin HhaI, HindIII, NotI, BbvCI, EcoRI, BglI, ve AlwI'yi içerebilir. Bazı endonükleazların (ör. FokI) sadece dimerler olarak işlev görebilmesi, TAL efektörünün hedef spesifikliğini geliştirmek üzere kullanılabilir. Örneğin, bazı durumlarda, her bir FokI monomeri, bir farklı DNA hedef dizisini tanıyan bir TAL efektör dizisine kaynaştırılabilir ve sadece iki tanıma sahası yakın olduğu zaman inaktif monomerler bir araya gelerek bir fonksiyonel enzim oluşturur. Nükleazı aktive etmek için DNA

bağlanmasını gerekli görerek, bir yüksek düzeyde sahaya özgü restriksiyon enzimi oluşturulabilir. Burada belirtildiği şekilde bir diziye özgü TALEN, bir hücrede mevcut olan önceden seçilmiş bir hedef nükleotit dizisi içindeki özel bir diziyi tanıyabilir. Böylelikle, bazı yapılandırmalarda, bir hedef nükleotit dizisi, nükleaz tanıma sahaları için taranabilir ve bir özel nükleaz hedef dizisine dayalı olarak seçilebilir. Diğer durumlarda, bir TALEN, bir özel hücresel diziyi hedef alacak şekilde tasarlanabilir. İstenilen TALEN'i kodlayan bir nükleotit dizisi, herhangi bir uygun ekspresyon vektörüne dahil edilebilir ve bir veya daha fazla ekspresyon kontrol dizisine bağlanabilir. Örneğin, bir nükleaz kodlama dizisi, dönüştürülecek olan bitki türlerinde endonükleazın konstitütif ekspresyonuna neden olacak bir promotör dizisine işlevsel olarak bağlı olabilir. Alternatif olarak, bir endonükleaz kodlama dizisi, bir koşullu ekspresyona neden olacak bir promotör dizisine işlevsel olarak bağlanabilir (ör, belli besinsel koşullar altında ekspresyon). Örneğin, karnabahar mozaik virüsü (3 5 S) promotörü konstitütif ekspresyon için kullanılabilir. Diğer konstitütif promotörler arasında sınırlama olmaksızın nopalin sintaz promotörü, ubikutin promotörü ve aktin promotörü yer alır. Bazı yapılandırmalarda bir yapay estrogen endükeli promotör koşullu ekspresyon için kullanılabilir ve bir bitki estrogene maruz bırakıldığı zaman yüksek transkripsiyon seviyeleri elde edilebilir. Kullanılabilecek diğer koşullu promotörler arasında örneğin ısıнын endüke ettiği ısı şok gen promotörleri, ribuloz bisfosfat karboksilazın büyük alt birimini kodlayan genden alınan gibi hafif regüle edilmiş promotörler yer almaktadır.

Terapi amaçlarına yönelik olarak, mevcut buluşun TAL efektörü DNA modifiye eden enzimi ve bir farmasötik olarak kabul edilebilir ekspriyeni bir terapötik olarak etkili miktarda verilebilir. Bu tür bir kombinasyonun, eğer verilen miktar fizyolojik olarak önemli ise bir "terapötik olarak etkili miktarda" verildiği söylenebilir. Bir ajan, eğer mevcudiyeti

alıcının fizyolojisinde tespit edilebilir bir değişiklik ile sonuçlanıyorsa fizyolojik olarak önemlidir. Mevcut bağlamda, bir ajan, eğer mevcudiyeti hedeflenen hastalığın bir veya daha fazla semptomunun ciddiyetinde ve lezyon veya anormalliğin bir genom düzeltmesinde bir azaltma ile sonuçlanıyorsa fizyolojik olarak önemlidir. Bir TAL efektörü DNA modifiye eden enzimini kodlayan hedefleme DNA ve/veya nükleik asitten oluşan vektörler, farklı bir çok yöntem ile bir hücreye dahil edilebilir (ör. enjeksiyon, doğrudan alım, projektil bombardımanı, lipozomlar, elektroporasyon gibi). TAL efektör DNA modifiye eden enzimleri, ekspresyon vektörleri kullanılmak suretiyle hücrelere stabil veya geçici olarak eksprese edilebilir. Ökaryotik hücrelerde ekspresyon teknikler, teknikte uzman kişiler tarafından beilinmektedir. (Bkz Current Protocols in Human Genetics: Chapter 12 "Vectors For Gene Therapy" and Chapter 13 "Delivery Systems for Gene Therapy").

Mevcut buluşun diğer bir yönünde, TAL efektörü DNA modifiye eden enzimi, heme hemen imünogenik olmayabilir - yani imünolojik cevap üretmez veya çok az üretir. Bu türün zararlı imünolojik reaksiyonlarını hafifletmek veya ortadan kaldırmak için bir çok farklı yöntem buluşla uyumlu olarak kullanılabilir. Bir tercih edilen yapılandırmada, TAL efektörü DNA modifiye eden enziminde N- normil metionin hemen hemen bulunmamaktadır. İstenmeyen imünolojik reaksiyonları önlemenin diğer bir yolu da, polietilen glikola (PEG) veya polipropilen glikola (PPG) TAL efektörü DNA modifiye eden enzimini konjüge etmektir (tercihan 500 ila 20,000 arası dalton ortalama moleküler ağırlıkta (MW)). Örneğin Davis et al (US 4,179,337) tarafından tariff edilen PEG veya PPG ile konjügasyon, imünogenik olmayan, fizyolojik olarak aktif, suda çözülebilen TAL efektörü DNA modifiye eden enzim konjüгатları sağlayabilir ve bunların anti viral aktivitesi bulunur. Bir polietilen-polipropilen glikol kullanılarak benzer yöntemler Saifer et al (US 5,006,333)'de tarif edilmiştir.

Donör Vektörleri

Burada aynı zamanda donör nükleotit dizilerini içeren rekombinant nükleik asitler de sağlanmaktadır. Bir donör nükleotit dizisi, dönüştürülecek olan bir hücrenin genomu içinde endogenöz olarak bulunan bir önceden seçilen hedef nükleotit dizisine ilişkin olarak bir veya birden fazla modifikasyona sahip bir varyant dizisi içerebilir (yani ikame eden, silme veya ekleme) (aynı zamanda burada "modifiye edilmiş hedef nükleotit dizisi" olarak da bilinmektedir). Donör nükleik asit içindeki varyant dizisi tipik olarak hücre içindeki endogenöz hedef nükleotit dizisi ile aynı veya buan benzer diziler ile her iki taraftan desteklenmektedir, Destekleme dizileri herhangi bir uygun uzunluğa sahip olabilir ve tipik olarak uzunluk olarak en az 50 nükleotit (ör. en az 50 nükleotit, en az 75 nükleotit, en az 100 nükleotit, en az 200 nükleotit, en az 250 nükleotit, en az 300 nükleotit, en az 500 nükleotit, en az 750 nükleotit, en az 1000 nükleotit, yaklaşık 50 ila yaklaşık 5000 arası nükleotit, yaklaşık 100 ila 2500 arası nükleotit, yaklaşık 100 ila yaklaşık 1000 arası nükleotit, yaklaşık 100 ila 500 arası nükleotit, yaklaşık 200 ila yaklaşık 500 arası nükleotit, veya yaklaşık 250 ila yaklaşık 400 arası nükleotit)tir. Böylelikle, homolog rekombinasyon rekombinant donör nükleik asit konstrüktü ve varyant dizinin her iki kenarındaki endogenöz hedef üzerinde gerçekleşebilir, öyle ki sonuçta elde edilen hücrenin genomu, örneğin aynı genden olmak üzer endogenöz dizilerin bağlamı dahilinde varyant dizi içermektedir. Bir donör nükleotit dizisi, bir genom içindeki herhangi bir uygun diziyi hedef alacak şekilde üretilebilir. Örneğin bir bitkide, bir donör nükleotit dizisibir lipit biyosentetik gene, karbonhidrat biyosentetik genine, tohum depolama proteini genine, hastalık veya haşere direnç genine, stres tolerans genine, kıtlık tolerans genine veya bir anti besin üreten bir gene hedeflenebilir. Buna ek olarak, donör nükleotit dizisi, burada tarif edildiği şekilde bir diziyi özgü nükleaz için bir tanıma sahası içermektedir.

Seçilebilir markörler

Burada belirtilmiş olan yöntemlerden bazıları, bir seçilebilir

veya taranabilir markörü kodlayan bir üçüncü rekombinant nükleik asit kullanımım içerir. Bir seçilebilir özelliği sonuç veren bir polipeptiti kodlayan bir nükleotit, bir veya daha fazla ekspresyon kontrol dizisi içeren bir ekspresyon vektörüne dahil edilebilir. Örneğin, bir ekspresyon vektörü, dönüştürülecek olan bitkide konstitütif ekspresyona neden olacak bir promotör dizisine işlevsel olarak bağlı bir seçilebilir markör kodlayan dizi içerebilir. Uygun seçilebilir markörler arasında, sınırlama olmaksızın, kanamycin, G418, bleomycin, ampicillin, veya hygromycin gibi bir antibiyotiğe direnç veren polipeptitler, veya glufosinate, chlorosulfuron, veya phosphinothricin gibi herbisit yer almaktadır.

Örneğin bitkilerde kullanım için olan yapılandırmalarda, bir seçilebilir markör, bir imidazolinon veya bir sulfonilure gibi büyüme noktası veya meristemi inhibite eden bir herbisite direnç sağlayabilir. Örneğin ,767,366 sayılı ABD patenti, 5,928,937. sayılı ABD patenti, 4,761,373 sayılı ABD patenti ve 5,013,659 sayılı ABD patentinde tarif edildiği şekilde mutant ALS ve AHAS enzimleri için bu kategori kodundaki örnek polipeptitler, farklı imidazolinon veya sulfonamid herbisitlere dirençli bitkilere yöneliktir.

4,975,374 sayılı ABD patenti, örneğin fosfotrisin ve metionin sülfoksimini inhibite ettiği bilinen herbisitler tarafından inhibisyona karşı dirençli bir mutant glutamin sentetazı (GS) kodlayan bir geni içeren bitki hücreleri ve bitkiler ile ilgilidir.

5,162,602 sayılı ABD patenti, sikloheksanedion ve ariloksifenoksipropanoik asit herbisitleri tarafından inhibisyona karşı dirençli bitkileri açıklamaktadır. Direnç, değiştirilmiş asetil koenzim A karboksilazı tarafından verilmektedir (ACCase). Glifosata direnç için polipeptitler (Roundup® ticari ismi altında satılır) de bitkilerde kullanımı için uygundur. Bkz, örneğin, ABD Patent No. 4,940,835 ve 4,769,061. 5,554,798 sayılı ABD patenti, transgenic glifosfat

dirençli mısır bitkilerini açıklamaktadır ki bunlarda direnç bir değiştirilmiş 5-enolpyruvyl-3-phosphoshikimate (EPSP) sentazı ile verilmektedir. Bu polipeptitler, sınırlama olmaksızın, trimetilsülfonyum tuzu, izopropilamin tuzu, sodyum tuzu, potasyum tuzu ve amonyum tuzu gibi glifosat tuzlarını içeren glifosat herbisidal bileşimlerine karşı direnç sergileyebilir, Bkz, Ör. ABD Patent No. 6,451,735 ve 6,451,732. Glufosinat amonyum veya fosfinotrisin gibi fosfo bileşiklerineve piridinoksi veya fenoksi propiyonik asitleri ve sikloheksonlara direnç için polipeptitler de uygundur. Bkz. Örneğin Avrupa Yayın No. 0 242 246, ve ayrıca ABD Patent No. 5,879,903, 5,276,268, ve 5,561,236.

Diğer herbisitler arasında, triazin ve benzonitrli (nitrilaz) gibi fosfosentezi inhibite edenler yer almaktadır. Bkz. ör. ABD Patent No. 4,810,648. Diğer herbisitler arasında 2,2-dichloropropionic asit, sethoxydim, haloxyfop, imida-zolinone herbisitleri, sulfonylurea herbisitleri, triazolopyrimidine herbisitleri, s-triazine herbisitleri ve bromoksinil yer alır. Ayrıca birprotoks enzimine direnç katan herbisitler de bulunmaktadır. Bkz. ör., ABD Patent Yayın No. 20010016956 ve ABD Patent No. 6,084,155.

Bazı yapılandırmalarda, bir seçilebilir markörü kodlayan bir rekombinant nükleik asit, sahaya özgü rekombinasyon ile bir hücrenin genomuna entegre edilecek şekilde uyarlanabilir (ör. bir bitki hücresi veya bir hayvan hücresi). Örneğin, bir seçilebilir markör kodlayan bir dizi, örneğin Cre veya FLP gibi bir rekombinas için tanıma dizileri ile desteklenebilir. Diğer yapılandırmalarda, bir seçilebilir markörü kodlayan bir rekombinant nükleik asit, homolog rekombinasyon ile bir bitki genomuna integrasyon için uyarlanabilir. Bu nükleik asitlerde, seçilebilir markörü kodlayan dizi, rekombinant nükleik asidin dahil edileceği bitki hücresinin genomu dahilinde bulunan endogenöz nükleotit dizileri ile aynı veya bunlara benzer olan diziler tarafından desteklenebilir, Endogenöz dizilerden en az bir tanesi, bir diziye özgü nükleaz için klevaj sahasında

olabilir. Seçilebilir markörü kodlayan nükleik asit aynı zamanda bir diziye özgü nükleaz için bir tanıma sahası içerebilir. Nükleaz donör nükleotit dizisine hedeflenen ile aynı diziye özgü nükleaz olabilir, veya donör nükleotit dizisine hedeflenenden farklı bir diziye özgü nükleaz olabilir. Diğer yapılandırmalarda, bir seçilebilir markörü kodlayan bir rekombinant nükleik asit, meşru olmayan rekombinasyon ile bir bitki hücresinin genomuna entegrasyon için uyarlanabilir. Bu nükleik asitlerde tipik olarak, burada tarif edilmiş olan homolog veya sahaya özgü rekombinasyon için uyarlanan nükleik asitler içinde yer alan destekleme dizileri ve nükleaz tanıma sahası bulunmamaktadır.

Yöntemler

Burada belirtilmiş olan konstrüktlerden bir veya birden fazlası hücreleri dönüştürmek için kullanılabilir ve/veya hücrelere DNA modifiye eden enzim dahil edilebilir, öyle ki bir genetik olarak modifiye edilen organizma (ör. bir bitki veya hayvan) üretilir. Böylelikle, genetik olarak modifiye edilen organizmalar ve burada tarif edilmiş olan nükleik asitler ve/veya polipeptitleri içeren hücreler de sağlanabilir. Bazı yapılandırmalarda, bir dönüştürülen hücre, genomuna entegre edilmiş bir rekombinant nükleik asit konstrüktüne sahiptir, yani stabil olarak dönüştürülebilir. Stabil dönüştürülmüş hücreler tipik olarak her bir hücrebölümü ile dahil edilen nükleik asit dizisini tutmaktadır. Bir konstrükt homolog bir şekilde entegre olabilir, öyle ki dönüştürülen hücreye endogenöz olan bir nükleotit dizisi konstrükt ile değiştirilebilir ve burada konstrükt endogenöz diziye karşılık gelen bir dizi içerir, ancak endogenöz diziye göre bir veya daha fazla modifikasyon içerir. Şurası kaydedilmektedir ki bu tür bir modifiye edilmiş endogenöz diziyi içeren bir bitki veya hayvana burada "genetik olarak modifiye edilmiş organizma" (GMO) adı verilse de, modifiye edilmiş dizi bir transgen olarak değerlendirilmemektedir. Bir konstrükt aynı zamanda meşru olmayan bir şekilde entegre olabilir, öyle ki dönüştürülmüş hücrenin genomuna rastgele bir şekilde entegre

olabilir.

Alternatif olarak, bir hücre geçici olarak dönüştürülebilir, öyle ki konstrukt genomuna entegre olmaz. Örneğin, bir TALEN kodlama dizisini içeren bir plazmit vektörü bir hücreye dahil

5 edilebilir, öyle ki TALEN kodlama dizisi eksprese edilir ancak vektör genoma stabil bir şekilde entegre edilmez. Geçici olarak dönüştürülmüş olan hücreler tipik olarak her bir hücre bölümü ile dahi ledilmiş olan nükleik asit konstruktünün bir kısmı veya tamamını kaybeder, öyle ki dahil edilen nükleik asit, yeterli

10 sayıda hücre bölünmesinden sonra kız çocuk hücrelerinde tespit edilemez. Her halükarda, TALEN kodlama dizisinin ekspresyonu, bir donör dizisi ve bir endogenöz hedef dizisi arasında homolog rekombinasyona ulaşmak için yeterli değildir. Hem geçici olarak dönüştürülmüş ve stabil olarak dönüştürülmüş hücreler burada

15 tarif edilmiş olan yöntemlerde kullanılabilir. Genetik olarak modifiye edilmiş olan bitki hücreleime ilişkin olarak, burada tarif edilmiş olan yöntemlerde kullanılan hücreler, bir bütün bitkinin tamamı veya bir kısmını teşkil edebilir. Bu bitkiler, bir büyüme odasında, bir serada veya bir sahada değerlendirilen

20 türler için uygun bir şekilde yetiştirilebilir. Genetik olarak modifiye edilmiş bitkiler, örneğin diğer hatlara bir rekombinant nükleik asit eklemek, diğer türlere bir rekombinant nükleik asit transfer etmek için, veya diğer istenilen özelliklerin ilave seçimi için Özel bir amaç için istenildiği şekilde

25 yetiştirilebilir. Alternatif olarak, genetik olarak modifiye edilmiş bitkiler, bu tekniklere uygun türler için bitkisel olarak desteklenebilir. Progeni, bir özel bitki veya bitki hattının gelecek nesillerini de içermektedir. Bir örnek bitkinin progenisi, F₁, F₂, F₃, F₄, F₅, F₆ üzerinde oluşturulan tohumları,

30 ve BC₁, BC₂, BC₃ üzerinde oluşturulan daha sonraki nesil bitkileri veya tohumları, ve F₁BC₁, F₁BC₂, F₁BC₃ üzerinde oluşturulan daha sonraki nesil bitkileri ve tohumları ve daha sonra nesil bitkilerini içerir. Bir genetik olarak modifiye edilmiş bitki tarafından üretilen tohumlar, nükleik asit

35 konstruktü için homozigot tohumları elde etmek için

yetiştirilebilir ve "self" edilebilir (veya out-cross yapılabilir).

- Genetik olarak modifiye edilmiş hücreler (ör. bitki hücreleri veya hayvan hücreleri) istenilirse süspansiyon kültüründe, veya
- 5 doku veya organ kültüründe yetiştirilebilir. Burada belirtilmiş olan yöntemlerin amaçlarına yönelik olarak, katı ve/veya sıvı dokü kültürü teknikleri kullanılabilir. Katı ortamları kullanırken, hücreler doğrudan ortam üzerine yerleştirilebilir veya bir filtre film üzerine yerleştirilebilir ve daha sonra bu
- 10 da ortam ile temas halinde yerleştirilebilir. Sıvı ortam kullanırken, hücreler bir yüzdürme cihazı üzerine - örneğin sıvı ortam ile temas eden bir gözenekli membran üzerine yerleştirilebilir. Katı ortam tipik olarak ağar eklemek suretiyle sıvı ortamdan yapılabilir. Örneğin, bir katı ortam
- 15 ağar içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamı ve bir auksinin uygun bir konsantrasyonu, örneğin 2,4- dichlorophenoxyacetic asit (2,4-D) ve bir sitokininin bir uygun konsantrasyonu, örneğin kinetin olabilir. Bir hücre bir rekombinant nükleik asit konstrüklü ile veya birden fazla rekombinant nükleik asit konstrüktleri (ör.
- 20 2,3,4, veya 5) ile dönüştürülebilir. Eğer birden fazla konstrükt kullanılırsa, bunlar eş zamanlı veya sıralı olarak dönüştürülebilir. Birden fazla çeşit türü dönüştürmek için teknikler teknikte bilinmektedir. Burada tarif edilmiş olan polinükleotitler ve/veya rekombinant vektörleri,
- 25 elektroporasyon, mikro enjeksiyon ve biyolistik yöntemler dahil olmak üzere belli sayıda bilinen yöntemlerden herhangi biri kullanılarak bir barındırıcının genomuna eklenebilir. Alternatif olarak, polinükleotitler veya vektörler, uygun T-DNA destekleme bölgeleri ile birleştirilebilir ve bir geleneksel
- 30 Agrobacterium tumefaciens barındırıcı vektörüne dahil edilebilir. Bu Agrobacterium tumefaciens-aracılıklı dönüştürme teknikleri - ikili vektörlerin kullanımı ve silahsızlandırması dahil - teknikte iyi bilinmektedir. Diğer gen transferi ve transformasyon teknikleri arasında, çıplak DNA'nın
- 35 elektroporasyon aracılı alımı, kalsiyum veya PEG aracılığıyla

protoplast transformasyonu, lipozomun aracılık ettiği transfeksiyon, elektroporasyon, viral vektör aracılı transformasyon ve mikroprojektil bombardımanı yer almaktadır (bkz ör. 5,538,880, 5,204,253, 5,591,616, ve 6,329,571 sayılı ABD patentleri.) Eğer dönüşüm için alıcı doku olarak bir bitki hücresi veya doku kültürü kullanılırsa, bitkiler teknikte uzman olanların bileceği teknikler kullanılarak dönüştürülen kültürlerden yeniden üretilebilir.

Bazı yapılandırmalarda, bir DNA modifiye eden enzim (ör. bir TALEN) doğrudan bir hücreye dahil edilebilir. Örneğın, bir polipeptit mekanik enjeksiyon ile, bir vakteriyal tip III salgılama sistemi aracılığıyla aktarımla, veya *Agrobacterium* aracılı transfer ile dahil edilebilir. *Agrobacterium VirB/D4 taşıma sistemi ve bunun bitki hücrelerine bir nükleoprotein T kompleksinin transferine aracılık etmede kullanımı için* kz, ör., Vergunst et al. (2000) Science 290:979-982 .

Bitkilere ilişkin olarak ,burada tarif edilmiş olan polinükleotitler, vektörler ve polipeptitler, örneğın aspur, kaba yonca, soya fasulyesi, kahve, amarant, kolza (yüksek erüsik asit ve kanola) , yer fıstığı veya ayçiçeğı gibi dikotlar, ayrıca örneğın palmiye yağı , şeker kamışı , muz, sudangrass , mısır , buğday, çavdar, arpa , yulaf, pirinç gibi monokotlar, darı veya sorgum dahil monokotlar gibi bir çok monokosiledonöz ve dikotiledonöz bitkiler ve bitki hücresi sistemlerine dahil edilebilir. Ayrıca köknar ve çamgibi gimnospermiler de uygundur.

Bu nedenle, burada tarif edilmiş olan yöntemler, örneğın şu sıralara ait dikotildonöz bitkilerle kullanılabilir; Magniolales, Illiciales, Laurales, Piperales, Aristochiales, Nymphaeales, Ranunculales, Papeverales, Sarrace-niaceae, Trochodendrales, Hamamelidales, Eucomiales, Leitneriales, Myricales, Fagales, Casuarinales, Caryophyllales, Batales, Polygonales, Plumbaginales, Dilleniales, Theales, Malvales, Urticales, Lecythidales, Violales, Salicales, Cap-parales, Ericales, Diapensales, Ebenales, Primulales, Rosales, Fabales,

Podostemales, Haloragales, Myrtales, Cornales, Proteales, Santales, Rafflesiales, Celastrales, Euphorbiales, Rhamnales, Sapindales, Juglandales, Geraniales, Polygalales, Umbellales, Gentianales, Polemoniales, Lamiales, Plantaginales, Scrophulariales, Campanulales, Rubiales, Dipsacales, ve 5 Asterales. Burada tarif edilmiş olan yöntemler, sıralara ait olan monokotiledonöz bitkileri ile birlikte kullanılabilir: Alismatales, Hydrocharitales, Najadales, Triuridales, Commelinales, Eriocaulales, Restionales, Poales, Juncaceales, Cyperales, Typhales, Bromeliales, Zingiberales, Arecales, 10 Cyclanthales, Pandanales, Arales, Lilliales, ve Orchidales, ve ayrıca Gymnospermae ör. Pinales, Ginkgoales, Cycadales ve Gnetales sıraları ile kullanılabilir. Yöntemler örneğin dikot genera dahil olmak üzere bir çok farklı bitki türü üzerinde 15 kullanılabilir, örneğin: Atropa, Alseodaphne, Anacardium, Arachis, Beilschmiedia, Brassica, Carthamus, Cocculus, Croton, Cucumis, Citrus, Citrullus, Capsicum, Catharanthus, Cocos, Coffea, Cucurbita, Daucus, Duguetia, Eschscholzia, Ficus, Fragaria, Glaucium, Glycine, Gossypium, Helianthus, Hevea, 20 Hyoscyamus, Lactuca, Landolphia, Linum, Litsea, Lycopersicon, Lupinus, Manihot, Majorana, Malus, Medicago, Nicotiana, Olea, Parthenium, Papaver, Persea, Phaseolus, Pistacia, Piston, Pyrus, Prunus, Raphanus, Ricinus, Senecio, Sinomenium, Stephania, Sinapis, Solanum, Theobroma, Trifolium, Trigonella, 25 Vicia, Vinca, Vitis, and Vigna; the monocot genera Allium, Andropogon, Aragrostis, Asparagus, Avena, Cynodon, Elaeis, Festuca, Festulolium, Heterocallis, Hordeum, Lemna, Lobum, Musa, Oryza, Panicum, Pennisetum, Phleum, Poa, Secale, Sorghum, Triticum, ve Zea; veya gymnosperm türü Abies, Cunninghamia, 30 Picea, Pinus, ve Pseudotsuga Bir dönüştürülmüş hücre, callus, doku veya bitki, özel nitelikler veya faaliyetler bakımından, örneğin markör genleri veya antibiyotik direnç genleri bakımından işlenen hücrelerin seçilmesi veya taranması ile tanımlanabilir ve izole edilebilir. Bu tarama ve seçme 35 metodolojileri, teknikte normal düzeyde beceri sahibi olanlar

tarafından iyi bilinmektedir. Buna ek olarak, fiziksel ve biyokimyasal yöntemler, transformantları tanımlamak için kullanılabilir. Bunlar arasında, polinükleotitin tespiti için Southern analiz yöntemi veya PCR amplifikasyonu; RNA transkriptlerini tespit etmek için Northern blot, Sİ RNase koruma, primer genişletme veya RT-PCR amplifikasyonu; polipeptitler ve polinükleotitlerin ribozom aktivitesi veya enzimi tespit etmek için enzimatik eşeyler; ve polipeptitleri tespit etmek için protein jel elektroforezi, Western blok, imünopresipitasyon ve enzim bağlantılı imüno eşeyler yer alır. Polipeptitler ve/veya polinükleotitlerin ekspresyonu veya mevcudiyetini tespit etmek için in situ hibridizasyon, enzim boyaması ve imüno boyama gibi diğer teknikler de kullanılabilir. Referansta bulunulan tekniklerin tamamını gerçekleştirmek için yöntemler iyi bilinmektedir. Bitki hücrelerine stabil olarak dahil edilen polinükleotitler, örneğin standart yetiştirme teknikleri kullanılarak diğer bitkilere dahil edilebilir. Mevcut buluşun bağlamında, "ökaryotik hücreler", aşağıda listelenmiş olan organizmalarda türetilmiş ve in vitro kültür için tespit edilmiş organizmalardan türetilen bir mantar, maya, bitki veya hayvan hücresi veya hücre hattını ifade etmektedir. Daha terihan, mantarlar şu cinslerden olabilir: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Chrysosporium*, *Mortierella*, *Kluyveromyces* veya *Pichia*. Daha tercihan, mantarlar şu türlerden olabilir: *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum*, *Acremonium chrysogenum*, *Trichoderma reesei*, *Mortierella alpine*, *Chrysosporium lucknowense*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris* veya *Pichia ciferrii*. **Mevcut buluşta, bitki şu cinslerden olabilir:** *Arabidopsis*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Lactuca*, *Brassica*, *Oryza*, *Asparagus*, *Pisum*, *Medicago*, *Zea*, *Hordeum*, *Secale*, *Tritium*, *Capsicum*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Citrullis*, *Citrus*, or *Sorghum*. Daha tercihan bitki şu türlerden olabilir: *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana*

tabaccum, Solanum lycopersicum, Solanum tuberosum, Solanum melongena, Solanum esculentum, Lactuca saliva, Brassica napus, Brassica oleracea, Brassica rapa, Oryza glaberrima, Oryza sativa, Asparagus officinalis, Pisum sativum, Medicago sativa, Zea mays, Hordeum vulgare, Secale cereal, Tritium aestivum, Triticum durum, Capsicum sativus, Cucurbita pepo, Citrullus lanatus, Cucumis melo, Citrus aurantifolia, Citrus maxinia, Citrus media, veya Citrus reticulata.

5

10

15

Mevcut buluşta, hayvan hücreleri Homo, Rattus, Mus, Sus, Bos, Danio, Canis, Felis, Equus, Salmo, Oncorhynchus, Galls, Meleagris, Drosophila, or Caenorhabditis; more preferably, the animal cell can be of the species Homo sapiens, Rattus norvegicus, Mus musculus, Sus scrofa, Bos taurus, Danio rerio, Canis lupus, Felis catus, Equus caballus, Oncorhynchus mykiss, Gallus gallus, or Meleagris gallopavo cinsinden olabilir.

20

Hayvan hücreleri, sınırlandırıcı olmayan örnekler olarak, Salmo salar, Telesot balığından , veya zebra balığından bir balık hücreleri olabilir. Mevcut buluştaki hayvan hücreleri sınırlandırıcı olmayan örnek olarak *Drosophila melanogaster* 'de bir böcek hücreleri olabilir; hayvan hücreleri, sınırlandırıcı olmayan örnek olarak *Caenorhabditis elegans* tan bir kurt hücreleri de olabilir.

25

30

35

Mevcut buluşta, hücre bir bitki hücreleri, bir memeli hücreleri, bir balık hücreleri, bir böcek hücreleri veya in vitro kültürler için bu organizmalardan türetilen hücre hatları veya canlı dokulardan doğrudan alınan ve in vitro kültür için tespit edilen primer hücreleri olabilir. Sınırlandırıcı olmayan örnekler olarak, hücre hatları şunlardan oluşan gruptan seçilebilir: CHO-K1 hücreleri; HEK293 hücreleri; Caco2 hücreleri; U2-OS hücreleri; NIH 3T3 hücreleri; NSO hücreleri; SP2 hücreleri; CHO-S hücreleri; DG44 hücreleri; K-562 hücreleri, U-937 hücreleri; MRC5 cells; IMR90 hücreleri; Jurkat hücreleri; HepG2 hücreleri; HeLa hücreleri; HT-1080 hücreleri; HCT-116 hücreleri; Hu-h7 hücreleri; Huvec hücreleri; Molt 4 hücreleri.

Tüm bu hücre hatları mevcut buluşun yöntemi ile modifiye edilerek ilgili bir gen veya proteinin üretilmesi, eksprese edilmesi, kantifiye edilmesi, tespit edilmesi ve çalışılması için hücre hattı modelleri sağlanabilir; bu modeller, sınırlandırıcı olmayan örnekler olarak kimyasal, biyo yakıt, terapötik ve agronomi gibi farklı alanlarda araştırma ve üretimde ilgili biyolojik olarak aktif molekülleri taramak için de kullanılabilir.

Mevcut buluş aynı zamanda örneğin hücreler içindeki genetik malzemeyi değiştirme, gen ekspresyonunu modüle etme, örneğin anti viral terapilerde patojenik dizileri hedef almak için TAL efektörleri dahilindeki diziye özgü DNA bağlanma etki alanlarını güçlendirmek için modeller sağlamaktadır. Örneğin, bazı yapılandırmalarda, mevcut buluş, hücresel genetik malzemenin modifiye edilmesi için yöntemler sağlamaktadır. Bazı yapılandırmalarda, yöntemler bir TAL efektör DNA bağlanma etki alanı veya bir polipeptiti kodlayan bir nükleik asit içeren bir polipeptitin bir hücreye dahil edilmesini içerir TAL efektörü DNA bağlanma etki alanı, bir DNA modifiye edici enziminin tamamı veya bir kısmına kaynaştırılabilir (ör. bir endonükleaz). Bazı yapılandırmalarda, yöntemler, bir hücreye iki veya daha fazla rekombinant nükleik asidinin dahil edilmesini içerir. Bir birinci rekombinant nükleik asidi, hücrede bulunan karşılık gelen, önceden seçilmiş bir hedef nükleotite ilişkin olarak bir veya daha fazla modifikasyon (yani ikame, silme veya ekleme) içeren bir donör nükleotit dizisini içermektedir. Donör nükleotit dizisi endogenöz hedef nükleotit dizisi ile homolog rekombinasyona tabi tutulabilir, öyle ki endogenöz dizi veya bunun bir kısmı, donör dizi veya bunun bir parçası ile değiştirilir. Hedef nükleotit dizi tipik olarak bir diziye özgü TALEN için bir tanıma sahası içermektedir. Bazı durumlarda, bir hedef nükleotit dizisi iki veya daha fazla ayrı TALEN için tanıma sahalar içerebilir (ör., ayrı olan iki karşılıklı hedef dizisi, öyle ki ayrı DNA dizisi bağlanma spesifikliğine sahip TALEN'ler kullanılabilir). Bu gibi durumlarda, DNA klevajının

spesifikliği, sadece bir hedef dizinin (veya aynı hedef dizinin birden fazla kopyalarının) kullanıldığı durumlara kıyasla artırılabilir.

Bir ikinci rekombinant nükleik asit, hedef nükleotit dizideki tanıma sahasına bağlanan bir diziye özgü TALEN kodlayan bir nükleotit dizisi içermektedir. Bazı durumlarda, donör nükleotit dizisi ve diziye özgü nükleotiti kodlayan nükleotit dizisi, aynı nükleik asit konstrüktünde yer alabilir. Alternatif olarak, donör nükleotit dizisi ve TALEN kodlama dizisi ayrı konstrüktlerde yer alabilir veya TALEN polipeptiti doğrudan üretilerek bir hücreye dahil edilebilir.

Bazı yapılandırmalarda, bir seçilebilir markörü kodlayan bir nükleotit dizisi içeren bir üçüncü rekombinant nükleik asit de kullanılabilir. İkinci ve üçüncü rekombinant nükleik asitler, endogenöz dizilerle rekombinasyona tabi olabilir ve bu şekilde hücrenin genomuna entegre olabilir. Bu rekombinasyon olayları meşru olmayabilir (yani rastgele) veya homolog rekombinasyon aracılığıyla veya sahaya özgü rekombinasyon aracılığıyla gerçekleşebilir. Rekombinant nükleik asitler hücreye eş zamanlı veya sıralı bir şekilde dönüştürülebilir ve transformasyondan önce linearize edilebilir. Hücre bir bitki hücresi olduğunda, burada tarif edilmiş olan yöntemler dönüştürülen hücreyi içeren bir bitkinin üretilmesi, bitkinin progenisinin üretilmesi, seçilebilir markörü (dahilse) eksprese eden bitkiler için seçme veya taramanın yapılması, seçilen bitkilerin progenisinin üretilmesi ve hedef nükleotit dizide rekombinasyon için bitkilerin (ör. doku, tohum, prekürsör hücreleri ve tam bitkiler) veya bitkilerin progenisinin test edilmesini içerebilir. Bazı durumlarda, yöntemler, seçilebilir markörü çıkartmak için seçilen bitkileri out-crossing yapmayı ve/veya diziye özgü nükleazın olmadığı durumlarda seçilen veya out-cross edilen bitkilerin taranmasını içerebilir.

Bazı yapılandırmalarda, mevcut buluş, bir hücrenin, örneğin bir prokaryotik hücrenin bir hayvan hücresinin veya bir bitki hücresinin genetik malzemesinin modifiye edilmesi için

yöntemler sağlamaktadır. Bu yöntemler, hücreye, hücrede mevcut olan bir karşılık gelen hedef nükleotit dizisine ilişkin olarak nükleotit dizide bir veya daha fazla modifikasyon ve bir diziye özgü TALEN için bir tanıma sahası içeren bir modifiye edilmiş hedef nükleotit dizisini içeren bir birinci rekombinant nükleik asidin , ve diziye özgü TALEN kodlayan bir nükleotit dizisi içeren bir ikinci rekombinant nükleik asidin dahil edilmesini içerir. Hücre bir bitki hücresi olduğunda, hücreyi içeren bir bitki üretilebilir ve bitkiden (veya bunun progenisinden) elde edilen hücreler, tohum veya doku, hedef nükleotit dizide rekombinasyon için analiz edilebilir. Birinci ve ikinci rekombinant nükleik asitler hücreye eş zamanlı veya sıralı bir şekilde dönüştürülebilir ve biri veya ikisi transformasyondan önce linearize edilebilir. Bazı durumlarda, birinci ve ikinci rekombinant nükleik asitleri, aynı konstrükt içinde mevcut olabilir.

Bazı durumlarda, yöntem aynı zamanda bir seçilebilir markörü kodlayan bir nükleotit dizisi içeren bir üçüncü rekombinant nükleik asidin hücreye dahil edilmesini ve hücrenin mi, yoksa hücreden üretilen bir organizmanın mı yoksa bunun progenisinin mi seçilebilir markörü eksprese ettiğinin tespit edilmesini içerebilir. Yöntem aynı zamanda organizmanın veya progenisinin seçilebilir markörün yokluğu bakımından taranmasını adımını da içerebilir. Seçilebilir markörü kodlayan nükleotit dizisi, bir ikinci diziye özgü nükleaz için klevaj sahasında hücreye endogenöz nükleotit dizilerine benzer veya bunlar ile aynı nükleotit dizileri ile, veya bir diziye özgü rekombinaz için tanıma sahaları ile her iki taraftan desteklenebilir veya desteklenmeyebilir Bazı durumlarda, yöntem organizmanın out-cross edilesi adımını içerebilir. Out-cross'un progenisi, seçilebilir markörün yokluğu bakımından taranabilir.

Mevcut buluş aynı zamanda bir hücrenin (örneğin bir bitki hücresi veya bir hayvan hücresi) genetik malzemesinin modifiye edilmesi için yöntemler sağlamaktadır ve bu yöntemler şunlardan oluşmaktadır:

Homolog rekombinasyonun gerçekleşmesinin istendiği örneğin bir kromozomal, mitokondriyal veya kloroplast dizisi gibi bir hedef DNA dizisini içeren bir hücrenin sağlanması;

5 Hedef DNA dizisi içindeki bir spesifik nükleotit dizisine bağlanan birden fazla TAL efektörüne sahip bir TAL efektör etki alanı ve bir DNA modifiye eden enzim etki alanı içeren (ör. bir endonükleaz etki alanı) bir TALEN sağlanması;

Hedef DNA'nın en azından bir kısmına homolog bir dizi içeren bir nükleik asit sağlanması; ve

10 ve hedef DNA dizisinin hücredeki TAL endonükleaz ile temas ettirilmesi suretiyle, hücredeki hedef DNA dizisi içindeki veya buna bitişik bir nükleotit dizisinin her iki ipliğini ayırması. Bu tür bir klevaj, hedef DNA dizisinde homolog rekombinasyonun sıklığını artırabilecektir. Hedef DNA dizisi, hücreye endogenöz
15 olabilir. Yöntemler, TAL endonükleazı kodlayan bir cDNA içeren bir vektörün hücreye dahil edilmesini ve hücrede bir TAL endonükleaz proteinin eksprese edilmesini içerebilir. Bazı durumlarda, TAL endonükleaz proteininin kendisi bir polipeptit mekanik enjeksiyon ile, bir bakteriyel tip III salgılama sistemi
20 aracılığıyla aktarımla, veya Agrobacterium aracılı transfer ile dahil edilebilir.

Burada tarif edilmiş olan yöntemler, farklı durumlarda kullanılabilir. Örneğin tarımda burada tarif edilmiş olan yöntemler, bir hedef sahada homolog rekombinasyonu
25 kolaylaştırmak için , bir bitki hattı, çeşidi veya hibritten daha önceden entegre edilmiş bir transgenin temizlenmesi (ör. ör. bir herbisit dirençli transgen) için kullanılabilir. Burada tarif edilmiş olan yöntemler, bir endogenöz geni modifiye etmek için de kullanılabilir, öyle ki gen tarafından kodlanan enzim
30 herbisit direnci verir - örneğin bir endogenöz 5-enolpyruvyl shikimate-3-fosfat (EPSP) sentaz geninin modifikasyonu ; böylelikle modifiye edilen enzim, glifosfat herbisite direnç verir. Diğer bir örnek olarak, burada tarif edilmiş olan yöntemler, bir bitki veya memeli metabolik yolunda bir veya daha

fazla endogenöz gen için düzenleyici bölgelerde homolog rekombinasyonu kolaylaştırmak için kullanılabilir (ör. yağlı asit biyosentezi) böylelikle bu genlerin ekspresyonu istenilen bir şekilde modifiye edilir. Burada tarif edilmiş olan yöntemler, ilgili bir veya daha fazla endogenöz gende bir hayvanda (ör. bir sıçan veya bir fare) homolog rekombinasyonu kolaylaştırmak için kullanılabilir, örneğin, sınırlandırıcı olmayan örnekler olarak, hücre yüzeyi markörlerini kodlayan metabolik ve dahili sinyalleme yolları, bir özel hastalık ile bağlantılı olduğu tanımlanan genler, ve bir hayvan hücresinin bir özel fenotipinden sorumlu olduğu bilinen herhangi bir gen gibi.

Mevcut açıklama aynı zamanda özel DNA dizileri ile etkileşime girme kapasitesine sahip diziye özgü TAL efektörlerini tasarlamak için yöntemler sağlamaktadır (ör. spesifik lokasyonlarda DNA klevajı kapasitesine sahip TALEN'ler), Yöntemler, TAL efektör bağlanmasının istendiği bir hedef nükleotit dizinin (ör. bir endogenöz kromozomal dizi, bir mitokondriyal DNA dizisi veya bir kloroplast DNA dizisi), (ör. bir çift iplikli kesimin sağlanmasının istendiği bir ikinci nükleotit dizisine bitişik bir dizi), tanımlanması ve kombinasyon halinde hedef diziye bağlanan birden fazla DNA bağlanma tekrarı içeren bir diziye özgü TAL efektörünün tasarlanmasını içerebilir. Burada tarif edildiği, TAL efektörleri, DNA ile etkileşimde bulunma spesifikliğini tespit eden sayıda kusur tekrarını içermektedir. Her bir tekrar,tekrarın 12 ve 13 kalıntılarında özel di-amino asit dizisine bağlı olarak bir tek baza bağlanmaktadır. Böylelikle, bir rTAL efektörü içinde tekrarları tasarlamak suretiyle (ör. burada tarif edilmiş olan standart teknikler veya teknikler kullanılarak) özel DNA sahaları hedef alınabilmektedir. Bu işlenen TAL efektörleri örneğin özel DNA dizilerine hedeflenen transkripsiyon faktörleri olarak kullanılabilir. Jenerik TAL efektörünün bir diyagramı Şekil 1A'da gösterilmektedir ve tekrar bölgesi açık kutularla gösterilmektedir ve temsili tekrar

dizisindeki RVD (SEQ ID NO: altı çizili olarak yer almaktadır.

RVD'lerin ve bunlara karşılık gelen hedef nükleotitlerin örnekleri Tablo 1A'da gösterilmektedir (Ayrıca bkz, PCT Yayın No. W02010/079430)

5

Tablo 1A

RVD	Nucleotit
HD	C
NG	T
NI	A
NN	G veya A
NS	A veya C
N*	C veya T

(devamı)

RVD	Nucleotit
HG	T
H*	T
IG	T

10 • RVD'nin ikinci pozisyonunda

• bir amino asit kalıntısının

bulunmamasına karşılık gelen tekrar dizisindeki boşluğu göstermektedir.

Diğer RVD'ler ve karşılık gelen hedef nükleotitleri Tablo

15 1B'de gösterilmektedir.

Tablo 1B

RVD	Nükleotit
HA	C
ND	C
NK	G
H1	C
HN	G
NA	G
SN	G veya A
YG	T

Diziye özgü DNA klevaj ma sahip olunmasının arzu edildiği durumlarda, örneğin bir diziye özgü TALEN (a)kombinasyon halinde endogenöz kromozomal nükleotit dizisine bağlanan birden fazla DNA bağlanma tekrar etki alanı, ve (b) ikinci nükleotit dizisinde bir çift iplikli kesme üreten bir endonükleaz içerecek şekilde tasarlanabilir. Bu diziye özgü DNA klevajı, burada tarif edildiği şekilde homolog rekombinasyonu geliştirecek şekilde kullanılabilir. TALEN'ler için diğer kullanımlar örneğin virüslere karşı terapötikleri içermektedir. TALENter, viral DNA'yı klevaja uğratacak ve virülansı azaltacak ve ortadan kaldıracak şekilde özel viral dizileri hedef alacak şekilde tasarlanabilir.

Burada belirtilmiş olan malzemeler ve yöntemler, bir hedeflenmiş şekilde bir özel genin dizisini modifiye edecek şekilde kullanılabilir. Bir gen, bir işlenmiş TAL efektörünün hedefleneceği birden fazla dizi içerebilir. Ancak burada tarif edildiği şekilde belli hedef diziler daha etkili bir şekilde hedef alınabilir. Örneğin, Örnek 9'da belirtildiği gibi, özel özelliklere sahip olan diziler, TAL efektörleri tarafından daha etkili bir şekilde hedef alınabilir. Böylelikle, burada sağlanan yöntemler, özel kriterleri karşılayan hedef dizilerin tanımlanmasını içerebilir. Bunlar, şu özelliklere sahip dizileri içerir: i) 5 ' ucunda sahadan hemen önceki bir T ile 5' ila 3 ' arasında yer alır ve en az 15 bazlık uzunluktadır; ii) birinci (5') pozisyonunda bir T'ye ve ikinci pozisyonda bir A'ya sahip değildir; iii) son (3') pozisyonunda T'de biter ve son pozisyona bitişik bir G'ye sahip değildir; ve iv) 0-63% A, 11 -63% C, 0-25% G, ve 2-42% T'lik bir baz bileşime sahiptir.

Burada tarif edilmiş olan TALENter genellikle dimer olarak işlev gördüğü için, burada sağlanan yöntemlerin bazı yapılandırmaları, bir birinci genomik nükleotit dizinin ve ikinci genomik nükleotit dizinin bir hücrede tanımlanmasını

içermektedir ki burada birinci ve ikinci nükleotit dizi, yukarıda belirtilmiş olan kriterlerden en az birini karşılar ve 15-18 bp ile ayrılır. Bazı durumlarda, bir TALEN polipeptiti her bir nükleotit diziyeye bağlanabilir ve TALEN'de bulunan endonükleaz, 15- 18 bp aralayıcısı içinde klevaj olabilir.

Mevcut buluş ayrıca arzu edilen bir nükleik asidin katıldığı genetiği modifiye edilmiş hayvanlar üretmek için yöntemler de sağlamaktadır. Bu tür yöntemler, içine nükleik asidin katılmasının arzu edildiği bir endojenöz kromozomal hedef DNA dizisini içeren bir hücrenin elde edilmesi, endojenöz kromozomal hedef DNA dizisinin içerisinde bir çift sarmal kırığı oluşturmak için hücrenin içerisine bir TALEN'in katılması, endojenöz kromozomal hedef DNA'nın en azından bir kısmına benzer olan bir dizi içeren bir ekzojen nükleik asidin hücreye katılması (bu ekzojen nükleik asit ile endojenöz kromozal hedef DNA arasında homolog rekombinasyon gerçekleşmesini mümkün kılan koşullar altında gerçekleşmektedir) ve homolog rekombinasyonun gerçekleştiği birincil hücreden bir hayvanın üretilmesini içerebilmektedir. Homolog nükleik asit, örneğin, homolog rekombinasyon sonrasında bir geni bozan bir nükleotid dizisi, homolog rekombinasyon sonrasında bir geni ikame eden bir nükleotid dizisi, homolog rekombinasyon sonrasında bir gene nokta mutasyonu katan bir nükleotid dizisi veya homolog rekombinasyon sonrasında bir düzenleyici bölge tanıtan bir nükleotid dizisini içerebilmektedir.

Bu patentte sağlanan yöntemler aynı zamanda içerisine arzu edilen bir nükleik asidin katıldığı genetiği modifiye edilmiş bitkiler üretmek için de kullanılabilir. Bu tür yöntemler içine nükleik asidin katılmasının arzu edildiği bir endojenöz kromozomal hedef DNA dizisini içeren bir bitki hücresinin elde edilmesi, endojenöz kromozomal hedef DNA dizisinin içerisinde bir çift sarmal kırığı oluşturmak için hücrenin içerisine bir TALEN'in katılması, endojenöz kromozomal hedef DNA'nın en

azından bir kısmına benzer olan bir dizi içeren bir ekzojen nükleik asidin bitki hücresine katılması (bu ekzojen nükleik asit ile endojenöz kromozal hedef DNA arasında homolog rekombinasyon gerçekleşmesini mümkün kılan koşullar altında gerçekleşmektedir) ve homolog rekombinasyonun gerçekleştiği bitki hücresinden bir bitkinin üretilmesini içerebilmektedir.

Hücrelerde bu patentte sağlanan TALEN ile kolaylaştırılmış homolog rekombinasyon yöntemleriyle üretilen DNA, bu tür yöntemlerden geçmemiş hücrelerle kıyaslandığında modifiye edilmiş olmaktadır ve modifiye edilmiş DNA "genetiği modifiye edilmiş" olarak anılmaktadır. Ancak, bu tür hücreleri içeren organizmaların, bu tür bir modifikasyonun rastgele bir transgenin entegrasyonu yerine homolog bir rekombinasyonu içermesi nedeniyle düzenleme amacı dâhilinde GMO olarak kabul edilmemektedir. Bu doğrultuda, genetik modifikasyonlar oluşturmak için bu patentte tarif edilmiş olan TALEN ile kolaylaştırılmış yöntemlerin kullanılması, örneğin standart düzenleyici prosedürlerden ve onların ilgili süresinden ve maliyetlerinden kaçınılabilmesi nedeniyle avantajlı olabilmektedir.

Bu patentte sağlanan şekildeki diğer hedefli genetik rekombinasyon örnekleri bir hücreye (ör: bir bitki hücresi, böcek hücresi, teleost balık hücresi veya havyan hücresi), seçilen bir DNA hedef dizisine hedeflenen bir TALEN'i kodlayan bir nükleik asit molekülünün bir hücreye katılmasını, hücredeki TALEN'in ekspresyonunun indüklenmesini ve seçilen DNA hedef dizisinin bir mutasyon (ör: genetik materyalin silinmesi, genetik materyalin eklenmesi veya genetik materyalin hem silinmesi, hem de eklenmesi) sergilediği bir rekombinant hücrenin tespit edilmesini içerebilmektedir. Ayrıca hücreye bir donör DNA da katılabilmektedir.

Bazı yapılandırmalarda monomerik bir TALEN

kullanılabilmektedir. Bu patentte tarif edilen şekildeki TALEN'ler tipik olarak, iki TAL efektör alanının her biri FokI restriksiyon enziminin katalitik alanına bağlandığı şekilde bir aralayıcı ile bir ikili tanıma alanı boyunca dimer işlevini görmekte, elde edilen her bir TALEN için DNA tanıma alanları bir aralık dizisiyle ayrılmaktadır ve her bir TALEN monomerinin tanıma alanına bağlantısı FokI'in dimer oluşturmaya ve aralayıcıda bir çift sarmal kırığı oluşturmaya izin vermektedir (bakınız, örneğin Moscou ve Bogdanove (2009) Science 326:1501). Ancak, monomerik TALEN'ler ayrıca tek TAL efektörün, işlev gerçekleştirmek için dimerizasyon gerektirmeyen bir nükleaza bağlandığı şekilde de oluşturulabilmektedir. Bu tür bir nükleaza bir örnek, iki monomerin tek bir polipeptit olarak eksprese edildiği, FokI'in tek zincirli bir varyantı olmaktadır (Minczuk et al. (2008) Nucleic Acids Res. 36:3926-3938). Diğer doğal oluşumlu veya tasarlanmış monomerik nükleazlar da bu rolü üstlenebilmektedir. Bir monomerik TALEN için kullanılan DNA tanıma alanı doğal oluşumlu bir TAL efektörden türetilmektedir. Alternatif olarak, DNA tanıma alanı spesifik bir DNA hedefini tanımak üzere yapılandırılabilir. İşlenen tek zincirli TALEN'lerin oluşturulması ve konuşlandırılması, sadece bir adet DNA tanıma alanı gerektirmeleri nedeniyle daha kolay olabilmektedir.

Bazı yapılandırmalarda, iki farklı DNA bağlayıcı alan (ör: bir TAL efektör bağlayıcı alanı ve bir diğer türden molekülden bir bağlayıcı alan) kullanılarak dimerik bir DNA dizisiye spesifik nükleaz üretilmektedir. Yukarıda belirtildiği gibi, bu patentte tarif edilen TALEN'ler tipik olarak bir aralayıcı ile bir ikili tanıma alanı boyunca dimer işlevini görmekte. Bu nükleaz mimarisi aynı zamanda örneğin bir TALEN monomeri ve bir çinko parmak nükleaz monomerinden üretilen hedefe özgü nükleazlar için kullanılabilmektedir. Bu tür durumlarda, TALEN ve çinko parmak nükleaz monomerleri için DNA tanıma alanları uygun uzunluktaki bir aralayıcı ile ayrılabilir. İki

monomerin bağlantısı FokI'in dimer oluşturmaya ve aralayıcıda bir çift sarmal kırığı oluşturmaya izin verebilmektedir. Örneğin homeo-alanlar, myb tekrarları ve lösin fermuarları gibi çinko parmak dışındaki DNA bağlayıcı alanlar da FokI'e bağlanabilmekte ve işlevsel bir nükleaz oluşturmak için bir TALEN monomeri ile ortak görevini görebilmektedir.

Bazı yapılandırmalarda, diğer protein alanlarını (ör: nükleaz olmayan protein alanları) spesifik nükleotid dizilerine hedeflemek için bir TAL efektör kullanılabilmektedir. Örneğin, bir TAL efektör, kısıtlama olmaksızın, DNA ile etkileşimde olan bir enzimden (ör: bir metilaz, bir topoizomera, bir integras, bir transpozaz veya bir ligaz), transkripsiyon aktivatörleri veya represörlerinden bir protein alanına veya histonlar gibi diğer proteinlerle etkileşime giren veya onları modifiye eden bir proteine bağlı olabilmektedir. Bu tür TAL efektör füzyonlarının uygulamalarına örneğin epigenetik düzenleyici elementlerin oluşturulması veya modifiye edilmesi, DNA'da alana özgü eklemelerin, çıkarmaların veya onarmaların gerçekleştirilmesi, gen ekspresyonunun kontrol edilmesi ve kromatin yapısının modifiye edilmesi dâhil olabilmektedir.

Bazı yapılandırmalarda, hedef dizinin aralayıcısı TALEN spesifitesini ve aktivitesini modüle etmek üzere seçilebilmektedir veya değiştirilebilmektedir. Burada, bir aralayıcı içeren ikili bir tanıma alanı boyunca dimer işlevini gören TALENler için sunulan sonuçlar, TALENlerin geniş çapta aralayıcı uzunluklarında işlev sergileyebildiğini ve TALENlerin aktivitesinin aralayıcı uzunluğuna bağlı olarak farklılık gösterebildiğini göstermektedir. Bakınız, örneğin, Örnek 6. Aralayıcı uzunluğundaki esneklik, aralayıcı uzunluğunun belirli dizilerin (ör: bir genomda) yüksek spesifiteyle hedeflemek için seçilebileceğini göstermektedir. İlaveten, aktivitede farklı aralayıcı uzunlukları için gözlemlenen varyasyon, aralayıcı uzunluğunun arzu edilen bir TALEN aktivitesini elde etmek için

seçilebileceğini göstermektedir.

Bazı yapılandırmalarda, TALEN aktivitesi DNA bağlayıcı alandaki (alanlardaki) tekrarların sayısını veya bileşimini değiştirerek modüle edilebilmektedir. Örneğin, bu tarifnamede Örnek 7'de

5 tarif edildiği gibi, PthXoI bazlı bir TALEN, AvrBs3 bazlı bir TALEN'e göre daha yüksek aktivite sergilemiştir. PthXoI, AvrBs3'ten, tekrarlamalarının hem sayısı, hem de RVD bileşimi açısından farklı olmaktadır. Ayrıca, bu proteinler için doğal oluşumlu DNA tanıma alanları, Moscou ve Bogdanove (yukarıda

10 geçen) tarafından tarif edilen TAL efektör DNA şifresine dayalı olarak öngörülen ilgili tanıma dizilerinden sapması açısından farklılık göstermektedir, ilaveten, aynı uzunlukta olan (12 RVD) ancak RVD bileşenleri açısından farklı olan birden fazla özel TALEN, aktiviteleri açısından farklılık göstermiştir ve 13 RVDTi

15 Özel bir TALEN, 12 RVDTi özel bir TALEN'den daha yüksek bir aktiviteye sahip olmuştur. Böylece, TALENlerin ilgilenilen bir DNA dizisini tanımak için işlenebilmesinin yanı sıra (1) tekrar sayısı aktiviteyi modüle

etmek için değiştirilebilmektedir, (2) farklı bağlanma alanları, farklı aktivite seviyeleri elde etmek için seçilebilmektedir ve (3) RVD'lerin bileşimi ve onların hedefe uyumu (şifreye göre) TALEN aktivitesini modüle etmek için değiştirilebilmektedir.

Örneğin, TALEN bir heterodimerik biçimde olduğunda (örneğin her biri bir TAL efektör alanı ve bir FokI nükleaz katalitik alan içeren farklı iki monomer içeren), RVDler iki TAL efektör alanının her birinde eşdeğer sayıda mevcut olabilmektedir veya her alan farklı sayıda RVD sergileyebilmektedir. Örneğin, belirli bir heterodimerik TALEN'de DNA'yı bağlamak için toplam 22 RVD kullanıldığında, iki TAL efektör alanının her birinde 11 tekrar mevcut olabilmektedir; alternatif olarak, iki TAL efektör alanının birinde 10 tekrar ve diğerinde 12 tekrar bulunabilmektedir. Mevcut buluş aynı zamanda bir monomer işlevini gören DNA modifiye edici enzim alanına sahip TALEN'i de içermektedir. Bu durumda, tüm RVDler, monomerik enzime bağlı olan tek bir TAL efektör alanında bulunabilmektedir. Bu durumda, etkili bağlanmayı temin etmek için RVD sayısının eşdeğer bir dimerik TALEN'de bulunan toplam RVD sayısına eşdeğer olmalıdır. Örneğin, iki farklı TAL efektör alanında 10 tekrara sahip olma (bir dimerik TALEN'in durumunda olduğu gibi) yerine biri tek bir TAL efektör alanında 20 tekrara sahip olacaktır (bir monomerik TALEN'in durumunda olduğu gibi).

Buluşun bir diğer yapılandırmasında, dimerik veya monomerik TALEN'deki toplam tekrar sayısı en az 14 olmaktadır. Buluşun bir diğer yapılandırmasında, dimerik veya monomerik TALEN'deki toplam tekrar sayısı en az 20 olmaktadır. Buluşun bir diğer yapılandırmasında, dimerik veya monomerik TALEN'deki toplam tekrar sayısı en az 24 olmaktadır. Buluşun bir diğer yapılandırmasında, dimerik veya monomerik TALEN'deki toplam tekrar sayısı en az 30 olmaktadır.

Bu patent başvurusu ayrıca bir hedef DNA için geliştirilmiş hedefleme kapasitesine sahip TAL efektör proteinleri üretmek için yöntemler sağlamaktadır.

5 Bu yöntemler, örneğin, her bir tekrarın hedef DNA'da bir temel çiftin tanınmasını tespit eden bir RVD içerdiği, her bir DNA bağlayıcı tekrarın hedef DNA'da bir temel çifti tanımadan sorumlu olduğu birden fazla DNA bağlayıcı tekrarına sahip bir DNA bağlayıcı alanı içeren bir TAL efektörü kodlayan bir nükleik asidin üretilmesini içerebilmektedir. Aşağıda Örnek 12'de tarif edildiği gibi, bağlayıcı alanın -1 konumunda T için gereksinimi hafifletmek, tasarlanmış TAL efektör proteinleri için hedefleme kapasitesini geliştirebilmektedir. Böylece, bir TAL efektör kodlama nükleik asidini üretmek A, C veya G için spesifikiteyle DNA bağlayıcı tekrar dizisinin 0. varyantını kodlayan bir 10 nükleik asidin eklenmesini ve böylece bağlayıcı alanda -1 konumunda T için gereksinimin elemine edilmesini içerebilmektedir.

İlaveten, bir hedef DNA için geliştirilmiş hedefleme kapasitesine sahip TAL efektörleri üretmek için yöntemler 20 sağlanmaktadır. Bu tür yöntemler her bir tekrarın hedef DNA'da bir temel çiftin tanınmasını tespit eden bir RVD içerdiği birden fazla DNA bağlayıcı tekrarına sahip bir DNA bağlayıcı alanı içeren bir TAL efektörü kodlayan bir nükleik asidin üretilmesini içerebilmektedir. Aşağıda Örnek 12'de tarif edildiği gibi, 25 NN'nin (G'yi tanıyan en yaygın RVD) spesifitesi genel olarak zayıf olmaktadır ve içeriğe göre değişkenlik gösterebilmektedir, ancak belirli RVDler G'ye karşı geliştirilmiş spesifiteye sahip olabilmektedir. Bu doğrultuda, bu tarifnamede sağlanan yöntemler, G'ye karşı sağlam spesifiteye 30 sahip olan alternatif RVD'ler kullanımını içerebilmektedir. Örneğin, bir veya daha fazla RVD, RN, R*, NG, NH, KN, K*, NA, NT, DN, D*, NL, NM, EN, E*, NV, NC, QN, Q*, NR, NP, HN, H*, NK, NY, SN, S*, ND, NW, TN, T*, NE, NF, YN, Y* ve NQ içeren grup

arasından seçilebilmektedir (* işareti RVD'nin ikinci konumunda bir boşluğu belirtmektedir).

imalat Ürünleri

- 5 Mevcut ifşa aynı zamanda örneğin TALEN Teri kodlayan nükleik asit molekülüleri, TALEN polipeptitleri, bu tür nükleik asit molekülülerini veya polipeptitleri içeren bileşimler veya TAL endonükleaz ile değiştirilmiş hücre çizgileri içeren imalat ürünleri sağlamaktadır. Bu tür ürünler örneğin araştırma araçları olarak veya terapötik olarak kullanılabilir.
- 10 Bazı yapılandırmalarda, bir imalat ürünü bu tarifnamede tarif edilen yöntemler kullanılarak üretilen bitkilerin tohumlarını içerebilmektedir. Tohumlar bu teknikte bilinen yöntemler kullanılarak uygun duruma getirilebilmektedir ve bu alanda bir imalat ürününü hazırlamak için kullanılan bilinen ambalajlama
- 15 materyalleri kullanılarak ambalajlanabilmektedir. Bir tohum paketi örneğin bir ambalaj materyaline iliştilirilmiş bir etiket veya işaret, ambalaj materyaline üzerine basılan bir etiket veya ambalajın içerisine yerleştirilen bir etikete sahip olabilmektedir. Etiket, ambalajdaki tohumların genetiği
- 20 değiştirilmiş bitki mahsulü üretebileceğini belirtebilmektedir ve genetiği değiştirilmemiş bitkilere nispeten genetik modifikasyonla değiştirilen özelliklerini tarif edebilmektedir.

Diğer tanımlar

- 25 - Bir polipeptit dizisinde aminoasit kalıntıları veya alt birimleri bu tarifnamede tek harfli bir kodla belirtilmektedir; örneğin, Q Gln veya Glütamin kalıntısı, R Arg veya Arjinin ve D Asp veya Aspartik asit kalıntısı anlamına gelmektedir.
- 30 - Aminoasit ikamesi bir aminoasit kalıntısının bir diğeriyle değiştirilmesi anlamına gelmektedir; örneğin, bir peptit dizisinde bir Arjinin kalıntısının bir Glütamin kalıntısıyla değiştirilmesi bir aminoasit ikamesi olmaktadır.

- Nükleotidler aşağıdaki şekilde belirtilmektedir: bir nükleosidin bazını belirtmek için tek harfli bir kod kullanılmaktadır: a adenin, t timin, c sitosin ve g guanin olmaktadır. Dejenere nükleotidler için, r g veya a'yı (pürin nükleotidleri), k g veya t'yi, s g veya c'yi, w a veya t'yi, m a veya c'yi, y t veya c'yi (pirimidin nükleotidleri), d g, a veya t'yi, v g, a veya c'yi, b g, t veya c'yi, h a, t veya c'yi ve n g, a, t veya c'yi temsil etmektedir,

"DNA modifiye edici enzim" terimi, DNA modifikasyon (bölünme, kovalent etkileşimi, su-aracılı etkileşim ...) seviyesi ne olursa olsun, bir hücrenin genetik materyalini modifiye etme kapasitesine sahip herhangi bir proteini ifade etmektedir. DNA ile etkileşime giren proteinler (ör: bir metilaz, bir topoizomeraaz, bir integras, bir transpozaz veya bir ligaz), transkripsiyon aktivatörleri veya represörleri, histonlar gibi diğer proteinler ve nükleazlar "DNA modifiye edici enzim" terimine dâhil olmaktadır. Bir TAL efektör DNA modifiye edici enzimde yer aldığı anda, DNA modifiye edici enzim DNA modifiye edici enzim alanı olarak anılmaktadır.

- "Nükleaz" terimi ekzonükleazları ve endonükleazları içermektedir.

- "Endonükleaz" terimi bir DNA ve RNA molekülü, tercihen bir DNA molekülü içerisindeki nükleik asitler arasındaki bağların hidrolizini (bölünmesini) katalize etme yeteneğine sahip herhangi bir yaban tipi veya varyant enzimi ifade edebilmektedir. Endonükleazların sınırlayıcı olmayan örneklerine FokI, HhaI, HindIII, NotI, BbvCI, EcoRI, BglI ve AlwI gibi tip II restriksiyon endonükleazları dâhil olmaktadır.

Endonükleazlar aynı zamanda tipik olarak uzunluk olarak yaklaşık olarak 12-45 baz çifti (bp) olan, daha tercihen 14-45 bp olan bir polinükleotit tanımına sahip nadir kesici endonükleazlar da içermektedir. Nadir kesici endonükleazlar, tanımlı bir lokusta DNA çift sarmal kırığının (DSB) indükleyerek HR'yi kayda değer olarak artırmaktadır (Rouet, Smih et al. 1994; Rouet, Smih et

al. 1994; Choulika, Perrin et al. 1995; Pingoud ve Silva 2007). Nadir kesici endonükleazlar örneğın bir yuvalanma endonükleazı (Paques ve Duchateau 2007), FokI gibi bir restriksiyon enziminin katalitik alanıyla işlenen çınko-parmak alanlarının füzyonundan
5 elde edilen bir kimerik Çınko-Pannak nükleaz (ZFN) (Porteus ve Carroll 2005) veya bir kimyasal endonükleaz (Eisenschmidt, Lanio et al. 2005; Arimondo, Thomas et al. 2006; Simon, Cannata et al. 2008) olabilmektedir. Kimyasal endonükleazlarda, bir kimyasal veya peptidik bölücü bir nükleik asit polimerine veya
10 spesifik bir hedef dizisini tanıyan bir diğerk DNA'ya konjuge edilmektedir ve böylece bölme aktivitesi spesifik bir diziye hedeflenebilmektedir. Kimyasal endonükleazlar aynı zamanda bir DNA bölücü molekülü olan ortofenantrolinin konjugeleri gibi sentetik nükleazları ve spesifik DNA dizilerini bağlamasıyla
15 bilinen tripleks oluştıurucu oligonükleotidler (TFO'lar) de kapsamaktadır (Kalish ve Glazer 2005). Bu tür kimyasal endonükleazlar mevcut buluşa göre "endonükleaz" teriminin kapsamında yer almaktadır. Bu tür nükleazların örneklerine aşağıdakiler dâhil olmaktadır: 1-Sce I, 1-

Chu I, I-Cre I, I-Csm I, Pl-Sce I, PI-Tli I, PI-Mtu I, I-Ceu I, I-Sce II, I-Sce III, HO, PI-Civ I, Pl-Ctr I, PI-Aae I, PI-Bsu I, PI-Dha I, PI-Dra I, PI-Mav I, PI-Mch I, PI-Mfu I, PI-Mfl I, PI-Mga I, PI-Mgo I, PI-Min I, PI-Mka I, PI-Mle I, PI-Mma I, PI-Msh I, PI-Msm I, PI-Mth I, PI-Mtu I, PI-Mxe I, PI-Npu I, Pl-Pfu I, PI-Rma I, PI-Spb I, PI-Ssp I, PI-Fac I, PI-Mja I, Pl-Pho I, PI-Tag I, PI-Thy I, PI-Tko I, PI-Tsp I, I-Msol.

10 Mevcut buluşa göre endonükleazlar bir Transkripsiyon Aktivatörüne Benzer (TAL) efektör endonükleazının (TALEN) parçası olabilmektedir.

- "TALEN" terimiyle her iki alanın füzyonunun bir "monomerik TALEN" sağladığı bir Transkripsiyon Aktivatörüne Benzer (TAL) efektör bağlayıcı alanı ve bir endonükleaz alanını içeren bir protein öngörülmektedir. Bazı monomerik TALEN'ler işlevsel olabilmektedir ve diğerleri bir diğer monomerik TALEN ile dimerizasyon gerektirebilmektedir, Dimerizasyon, her iki monomerik TALEN aynı olduğunda homodimerik bir TALEN ile sonuçlanabilmektedir veya monomerik TALEN farklı olduğunda heterodimerik bir TALEN ile sonuçlanabilmektedir. İki monomerik TALEN, örneğin onların RVD sayıları farklı olduğunda ve/veya en az bir RVD'nin içeriği (yani aminoasit dizisi) farklı olduğunda farklı olmaktadır. "TAL efektör DNA modifiye edici enzim" terimiyle bir Transkripsiyon Aktivatörüne Benzer efektör bağlayıcı alanı ve bir DNA modifiye edici enzim alanı içeren bir protein öngörülmektedir,

30 "Varyant" kelimesiyle bir "varyant" protein, yani doğada doğal olarak var olmayan ve genetik modifikasyonla veya rastgele mutajenez ile elde edilen, yani tasarlanmış bir protein ifade edilmektedir. Bu varyant protein örneğin yaban tipi, doğal oluşumlu bir proteinin aminoasit dizisinde en az bir kalıntının başka bir aminoasitle ikame edilmesiyle elde edilebilmektedir. Söz konusu ikame (ikameler) örneğin alana yöneltilmiş mutajenez ve/veya rastgele mutajenez aracılığıyla

gerçekleştirilebilmektedir.

5 "Hücre" veya "hücreler" ile herhangi bir prokaryotik veya ökaryotik canlı hücre, in vitro kültürler için bu organizmalardan türetilen hücre çizgileri, hayvan veya bitki kaynaklı birincil hücreler ifade edilmektedir.

10 "Birincil hücre" veya "birincil hücreler" ile doğrudan canlı hücreden (biyopsi materyali) alınan ve in vitro büyüme için oluşturulan, oldukça az popülasyonun ikiye katlanmasından geçen ve bu nedenle sürekli tümörijenik veya suni olarak ölümsüzleştirilen hücre çizgilerine nispeten türetildikleri dokuların ana işlevsel bileşenlerinin ve karakteristiklerinin daha iyi örneği olan hücreler ifade edilmektedir. Bu hücreler böylece ifade ettikleri *in vivo durum açısından daha değeri bir modeli temsil etmektedir.*

15 - "Homolog" kelimesiyle diziler arasında homolog rekombinasyon sağlayacak şekilde bir başkasına yeterli özdeşlik, daha spesifik olarak en az %95 özdeşlik, tercihen %97 özdeşlik ve daha tercihen %99 özdeşliğe sahip bir dizi ifade edilmektedir.

20 - "Özdeşlik" terimiyle iki nükleik asit molekülü veya polipeptidi arasındaki dizi özdeşliği ifade edilmektedir. Özdeşlik, her bir dizide karşılaştırma amacıyla hizalanmış olabilen bir konumun kıyaslanmasıyla tespit edilebilmektedir. Karşılaştırılan dizideki bir konumda aynı tabanla bulunduğu, molekül o konumda aynı olmaktadır. Nükleik asit veya aminoasit dizileri arasındaki bir benzerlik veya özdeşlik derecesi, nükleik asit dizileri tarafından paylaşılan konumlarda aynı veya eşleşen nükleotid sayısının bir fonksiyonu olmaktadır, iki dizi arasındaki özdeşliği hesaplamak için, GCG dizi analiz paketinin (University of Wisconsin, Madison, WI) bir parçası olarak mevcut olan ve örneğin varsayılan ayarda kullanılabilen FAŞTA veya BLAST dâhil olmak üzere çeşitli hizalama algoritmaları ve/veya programları

25

30

kullanılabilmektedir.

5 - "Mutasyon" terimiyle bir polinükleotit (cDNA, gen) veya bir polipeptit dizisinde bir veya daha fazla nükleotid/aminoasidin ikamesi, silinmesi veya eklenmesi ifade edilmektedir. Söz konusu mutasyon bir genin kodlama dizisini veya onun düzenleyici dizisini etkileyebilmektedir. Bu ayrıca genomik dizinin yapısını veya kodlanan mRNA'nın yapısını/stabilitesini etkileyebilmektedir.

10 - "Gen" terimiyle spesifik bir proteinin veya protein bölümünü kodlayan, bir kromozom boyunca lineer bir şekilde düzenlenmiş olan bir DNA bölümünü içeren, kalıtımın temel bir birimidir. Bir gen tipik olarak bir promotör, bir 5' dönüştürülmemiş bölge, bir veya daha fazla kodlama dizisi (eksonlar), isteğe bağlı olarak intronlar, bir 3' dönüştürülmemiş bölge içermektedir. Gen ayrıca bir
15 sonlandırıcı, güçlendirici ve/veya susturucu içerebilmektedir,

- "İlgilenilen gen" terimi bilinen veya varsayılan bir gen ürününü kodlayan herhangi bir nükleotid dizisini ifade etmektedir.

20 - Burada kullanılan şekliyle, "lokus" terimi bir DNA dizisinin (ör: bir genin) bir kromozomda spesifik fiziksel konumu olmaktadır. "Lokus" terimi genelde bir hedef dizisinin bir kromozomdaki spesifik fiziksel konumunu ima etmektedir.

25 - "Füzyon proteini" terimiyle orijinal olarak ayrı proteinleri kodlayan iki veya daha fazla genin birleştirilmesini içeren, söz konusu "füzyon geninin" translasyonunun orijinal proteinlerin her birinden türetilen işlevsel özelliklere sahip tek bir polipeptit sağladığı bu alandaki iyi bilinen prosesin bir sonucu ima edilmektedir.

30 - "Katalitik alan" terimiyle, söz konusu enzimin aktif alanını içeren bir enzimin protein alanı veya modülü ifade edilmektedir; aktif alanla söz konusu enzimin, substratın katalizinin gerçekleştiği kısmı ifade edilmektedir. Enzimler, ancak aynı zamanda onların katalitik alanları, katalize

ettikleri reaksiyona göre adlandırılmaktadır. Enzim Komisyon numarası (EC numarası), enzimler için, onların katalize ettiği kimyasal reaksiyonlara dayalı bir sayısal sınıflandırma olmaktadır (chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/). Mevcut ifşanın kapsamında, bir ortak olarak herhangi bir katalitik alan kullanılabilmekte ve bir TAL efektör DNA modifiye edici enzim elde edecek şekilde kimerik bir füzyon proteini üretmek için bir TAL efektör alanına bağlanabilmektedir. Bu tür katalitik alanların sınırlayıcı olmayan örnekleri Mmel, EsaSSII, CstMI, NucA, EndA Escherichia coli, NucM, E11dA Streptococcus pneumonia, SNase Staphylococcus aureus, SNase Staphylococcus hyicus, SNase shigella flexneri, Bacillus subtilis yncB, Endo deoksiribonükleaz 1 Enterobakteri faj T7, EndoG bovin, ttSnr DNA uyuşmazlığı onarım proteini mutS, Metnase'ın bölme alanınıninkiler olabilmektedir.

Mevcut buluşun uygulaması, aksi belirtilmediği sürece, teknikte yetkin kişilerin tecrübesi dâhilinde olan hücre biyolojisi, hücre kültürü, moleküler biyoloji, transjenik biyoloji, mikrobiyoloji, rekombinant DNA ve immünolojinin konvansiyonel tekniklerinden faydalanacaktır. Bu tür teknikler literatürde geniş bir şekilde tarif edilmektedir. Bakınız, örneğin, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, 2000, Wiley and son İne, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); U.S. Pat. No. 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (Harries ve Higgins eds. 1984); Transcription and Translation (Hames ve Higgins eds. 1984); Culture of Animal Cells (Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells and Enzyıues (IRL Press, 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the series, Methods in Enzymology (Abelson ve Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., New York), specifically, Vols. 154 ve 155 (Wu et al. eds.) ve Vol. 185, "Gene Expression Technology"

(Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Miller ve Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods in Celi and Molecular Biology (Mayer ve Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook of
5 Experimental Immunology, Vols. I-IV (Weir ve Blackwell, eds., 1986); ve Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

Buluşun yukarıdaki tarifnamesi, onun bu alanda yetkin herhangi bir kişi tarafından oluşturulmasını ve onu kullanmasını mümkün
10 kılacak şekilde bir yöntem ve proses sağlamaktadır ve bunlar özellikle ekteki istemlerdeki, orijinal tarifnamenin bir kısmını oluşturan konu içeriği için sağlanmaktadır.

Yukarıda kullanılan şekliyle, "-i içeren grup arasından seçilen", "arasından seçilen" ve benzerleri, belirtilen
15 materyallerin karışımlarını içermektedir.

Sayısal bir sınır veya aralık belirtildiğinde uç noktalar da dâhil olmaktadır. Ayrıca, bir sayısal sınır veya aralıktaki tüm değerler ve alt değerler açıkça yazılmışçasma spesifik olarak dâhil olmaktadır.

20 Yukarıdaki tarifname, bu teknikte yetkin bir kişinin buluşu oluşturmasını ve kullanmasını sağlayacak şekilde sunulmuştur ve belirli bir uygulamanın ve onun gereksinimlerinin kapsamında sağlanmıştır. Böylece, buluşun gösterilen yapılandırmalarla
25 sınırlandırılması öngörülmemektedir ve bu tarifnamede ifşa edilen ilkeler ve özelliklerle uyumlu en geniş kapsamı içermektedir.

Bu buluşun genel olarak tarif edilmesinin ardından, buluş ayrıca
30 sadece örnekleme 10 amacıyla sağlanan ve aksi belirtilmediği sürece buluşun istemlerde tanımlanan kapsamını sınırlandırmayan aşağıdaki spesifik örneklere yapılan atıflar aracılığıyla

daha net bir şekilde anlaşılabacaktır.

ÖRNEKLER

- 5 Örnek 1 - Bir şifre TAL efektör DNA tanımını yönetmektedir
TAL hedef alanında RVD'ler ve nükleotidler arasında bire bir,
lineer korrespondans olup olmadığını belirlemek için, on TAL
efektörün her biri için bilinen hedef geninin öngörülen promotör
alanı (belirtilmiş translasyonel başlangıç alanının hemen
10 öncesindeki 1.000 bp) RVD nükleotid ilişkilerinde entropiyi
(rastgele olma özelliğini) minimize eden hizalamalar için TAL
efektör RVD dizileriyle taranmıştır. Aşağıdaki formül entropinin
miktarını belirlemek için kullanılmıştır; R efektör için RVD
grubunu, D dört adet nükleotid grubunu (A, C, G, T) ve $f_{i,j}$ i'nin
15 RVD'nin j'nci nükleotid ile ilişkilendirildiği gözlemlenen sıklığı
temsil etmektedir:

$$\sum_{i \in R} \sum_{j \in D} \max_j(f_i) - f_{i,j}$$

- 25 Her bir promotörde birden fazla düşük entropi alanı
sunulmuştur. Ancak, efektör AvrBs3 için sadece bir adedi daha
20 önce aktivasyon için yeterli ve gerekli olarak belirlenen 54
bp upa20 promotör parçacığıyla eşleşmiştir ve bu doğrudan
AvrBs3 ile aktive edilen genlerde sıkça görülen UPA kutusuna
tekabül etmiştir (Kay et al., yukarıda geçen). Ayrıca, PthXol
25 ve AvrXa27 efektörleri için, her birinde sadece bir alan
onların ilgili hedefleri Os8N3 ve Xa27'nin aktive edilmiş veya
aktive edilmemiş allelleri arasında bir polimorfizm ile
örtüşmüştür. Bu üç bölge boyunca hizalamalarda RVD nükleotid
ilişkileri uyumlu olmuştur; bu nedenle, geriye kalan
30 hizalamalar bu ilişkilere dayalı olarak seçilmiştir ve bunun
sonucunda her bir TAL efektör hedef çifti için tam olarak bir
alan elde edilmiştir (ŞEK. 1B ve Tablo 2). Her bir alanın
öncesinde T yer almıştır (ŞEK. 1D).

RVD nükleotid ilişkileri tarafından sağlanan spesifiteyi değerlendirmek için, ilk olarak bir ağırlık matrisi on minimal entropi TAL efektör hedef alan hizalamaları boyunca gözlemlenen tüm RVD nükleotid ilişkilerinin sıklığına bağlı olarak üretilmiştir (ŞEK. 1B). Bunun ardından ağırlık matris, *Xanthomonas oryzae* pirinç patojeninin beş TAL efektörle (AvrXa27, PthXol, PthXo6, PthXo7 ve Tallc) en iyi eşleşme için pirinçteki *Oryza sativa* spp. japonica cv. Nipponbare (Osal, Sürüm 6.0, rice.plantbiology.msu.edu) her bir artıksız gen modelinin translasyonel başlangıcının başındaki 10.000 bp promotör bölgesini taramak için kullanılmıştır. AvrXa27 için, Xa27'nin (GenBank kayıt numarası AY986492) yukarı yönündeki dizi eklenmiştir. Bu yukarı yönlü dizi Nipponbare'de mevcut olmamaktadır. Gözlemlenen ilişki sıklıkları %90'da ağırlıklandırılmıştır ve geriye kalan %10 olası tüm ilişkilerin sıklıklarına eşit bir şekilde dağıtılmıştır. Hizalamalar ŞEK. 1 B'deki RVD nükleotid ilişki sıklıklarından türetilen sıklık skorunun negatif bir logaritması olarak alınan bir ağırlık matris skoru (y eksenini) kullanılarak sıralanmıştır. Bu doğrultuda, eşleşmeler daha iyi olmuştur. PthXol, PthXo6, PthXo7 ve Tallc için, deneysel olarak tespit edilen hedef geni en iyi veya neredeyse en iyi eşleşme olmuştur. Daha iyi eşleşmelerin başında bir T yer almamıştır, hedefi belirlemek için kullanılan mikro testte temsil edilmemiştir veya intronlar ve EST sergilememiştir. Ters kompleman promotör dizilerinin taranması, bilinen hedefler için ileri alanlarından daha iyi skora sahip hizalamalar sağlamamıştır. Bu sonuç, TAL efektörlerinin pozitif suşa bağlandığı anlamına gelmemektedir, ancak onların pozitif suşa istinaden ileri oryantasyonda işlev sergilediklerini belirtmektedir. Beşinci efektör AvrXa27'nin bilinen hedefi hasatlığa direnç geni Xa27 olmaktadır (Gu et al., yukarıda geçen). Bu eşleşme için daha zayıf sıra (5,368) kalibre edilmiş veya güncel ve suboptimal konak adaptasyonunu belirtmektedir. Daha iyi skora sahip alanlar muhtemelen patojenez için AvrXa27 tarafından hedeflenen genleri içermektedir.

Yine ağırlık matrisi kullanılarak, tüm pirin promotörlerini 40 adet ek X. oryzae TAL efektör ile tarayarak ve mikro test verisine (PLEXdb.org, kayıt numarası OS3) dayalı olarak enfeksiyon esnasında aktive edilen aşağı yönlü gen için en iyi hizamalar tutularak on adet ek hizalama elde edilmiştir (Tablo 3). İlk grupta olduğu gibi, her bir alanın başına bir T gelmektedir ve hiçbir ters suş alanı daha iyi skor almamıştır. Toplam 20 hizalamanın RVD nükleotid ilişkisi sıklıkları ŞEK, 1C'de gösterilmektedir. Bunlar, oldukça basit bir şifreyi teşkil etmektedir.

Genişletilmiş 20 TAL efektör nükleotid hizalamalarındaki RVD nükleotid sıklıkları yeni bir ağırlık matrisi oluşturmak üzere kullanılmıştır ve Python v 2.5'te (www.python.org) yeni bir hesaplama kodu yazılmıştır. Kod, belirli bir TAL efektöre eşleşmeler için herhangi bir DNA dizisi koleksiyonunu taramak için kullanılabilir ve gözlemlenen ve gözlemlenmeyen RVD nükleotid ilişkileri için kullanıcı tarafından tanımlanabilir bir ağırlık faktörü kullanılabilir. Bakınız, Moscou ve Bogdanove (yukarıda geçen).

Şifrede bazı dejenerasyon söz konusu olmaktadır. Güçlü ilişkiler, bağlanma afinitesinin çoğunu kapsayan bağlayıcıları temsil edebilirken, zayıf ilişkiler bir esneklik ölçüsü sağlamaktadır. Alternatif olarak, komşu etkiler de söz konusu olabilmektedir. Son anılan olasılık, RVD'de koşullandırılan her bir RVD'nin her iki tarafa nükleotid ilişkisi sıklığının tespit edilmesi ve ardından onların gözlemlenen toplam sıklıkla karşılaştırılması diğer bir deyişle, RVD nükleotid çiftlerinin sol veya sağdaki komşu RVD'ye göre sıralanmasıyla ve bu şekilde sıralanan her bir çiftin nispi sıklıklarının o çift için toplam sıklıkla karşılaştırılmasıyla araştırılmıştır. Komşuya göre sıralanan RVD nükleotid ilişkilerinin sıklıkları gözlemlenen toplam sıklığa göre kayda değer farklılık göstermemiştir ve bu da ilişkilerin içerikten bağımsız olduğunu göstermektedir.

Hedef alanını yandan kuşatan diziler, -1'deki T dışında korunan herhangi bir nükleotid sergilememiştir, ancak onların alanın ardından C açısından zengin ve içerisinde **G** açısından zayıf olduğu görülmüştür (Şek. 1D). Birkaç istisna dışında, alanlar belirtilmiş transkripsiyonal başlangıcın 60 bp yukarı yönünde başlamaktadır ve hiçbirisi translasyonel başlangıca 87 bp'den daha yakın olmamaktadır (Tablo 2 ve Tablo 3). RVD/nükleotid ilişkilerini düzenleyen diğer kurallar Örnek 4 ve 5 'te tarif edilmektedir.

Bu sonuçlar dâhilinde, bir genomda TAL efektör hedeflerinin öngörülmesi ve hedeflerin de novo olarak oluşturulması mümkün olmaktadır. Alanları öngörebilme yeteneği, hastalıkta önemli olan konak genlerin tespit edilmesini hızlandıracaktır. Hedefleri oluşturabilme yeteneği, korunan veya çoklu TAL efektöre yanıt veren dayanıklı direnç genlerinin tasarlanması için umut vaat etmektedir. TAL efektörlerini rastgele seçilmiş gen aktivasyonu için uyarlamak veya bağlanmış proteinleri DNA modifikasyonu için hedeflemek de burada tarif edilen şekilde mümkün olmaktadır.

Tablo 2

Deneysel olarak tanımlanan TAL efektör hedef çiftleri için öngörülen hedef alanı özellikleri

TAL efektör	Kaynak	RVD	Hedef gen	TcS
AvrXa27 ¹	Xanthomonas oryzae pv. oryzae PXO99 ^A	17	Xa27	
(pirinç)	27	-7	87	
AvrBs3 ²	X. campestris pv. vesicatoria	18	Bs3 (biber)	59 1 123

AvrBs3 ³	X. campestris pv. vesicatoria	18	UPA20 (biber)	72	1	150
AvrBs3Arepl 64 ¹ 5	Modifiye edilmiş AvrBs3	14	Bs3-E (biber)	85	1	136
AvrBs3Arepl 60 ⁴	Modifiye edilmiş AvrBs3	15	Bs3 (biber)	59	1	123
AvrHahl ⁶	X. gardneri	14	Bs3 (biber)	59	1	121
PthXol ⁷	X. oryzae pv. oryzae PXO99 ^A	24	Os8N3 (pirinç)	79	46	251
PthXo6	X. oryzae pv. oryzae PXO99	23	OsTFX1 (pirinç)			
PthXo7 ⁸ 333	X. oryzae pv. oryzae PXO99 ^A 44	22 469	OsTFIIAyl		(pirinç)	
Tallc 10	X. oryzae pv. oryzicola BLS256 -265	16 217	OsHENI		(pirinç)	
RVD'le tekrarı değişken çift						
r:	kalıntılar; TcS:		belirtilmiş transkripsiyona!			

başlangıç alanı; TIS: translasyonel başlangıç alanı.

Konumlar hedef alanının 5' ucuna göreler.

¹ Gu et al., *yukarıda geçen*

5 ² Kay et al. (2007) Science 318:648

³ Römer et al. (2007) Science 318:645

⁴ Herbers et al. (1992) Nature 356:172

⁵ Römer et al. (2009) Plant Physiol.

⁶ Schomack et al, (2008) New Phytologist 179:546

10 ⁷ Yang et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:10503

⁸ Sugio et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

Tablo 3

Pirinçte enfeksiyon esnasında aktive edilen

15 Xanthomonas oryzae TAL efektör aday hedefleri.

Efektör Suş RVD'ler			Pirinç lokusu					r	
TcS TATA kutusu TIS			q						
Değişiklik (misli)									
Tal1c	BLS256	16	OsHen1	1	10	-265	217	0.01	3,3
Tal2c	BLS256	27	Os03g0303	15	-16	-145	143	0.01	5,2
Tal2d	BLS256	16	Os04g4919	9	27	n.p.	102	3.9E-	
07		29,7							
Tal3b	BLS256	18	Os05g2759	42	34	-1	104	3.4E-	
08		8,5							
Tal4a	BLS256	26	Os03g3784	1	152	221	363	2.2E-	
04		2,6							
Tal4b	BLS256	14	Os09g3210	72	68	n.p.	271	8.0E-	

20

		03							
Tal4c	BLS256	23	Os06g370	18	31	n.p.	151	2.7E-	
10	17,1								
Tal6	BLS256	20	Os07g477	16	-15	-70	93	3.6E-	
02	21,6								
PthXo1	PXO99 ^A	24	Os8N3	1	79	46	251	1.0E-	
08	84,2								
PthXo6	PXO99 ^A	23	OsTFX1	2	31	-780	136	3.5E-	
03	2,8								
PthXo7	PXO99 ^A	22	OsTFIIAy	7	333	44	469	1.6E-	
06	4,5								
Tal9a	PXO99 ^A	20	OsHen1	1	44	-3	93	0.13	
Tal7a/8	PXO99 ^A	18	Os01g687	2	32	-197	102	1.5E-8,2	
a			40						
			1,7						
01									
Tal7b/8	PXO99 ^A	20	Os01g402	57	-2	-276	206	1.5E-	
b			90						
01			1,7						

- RVD'ler: tekrarı değişken çift kalıntılar; r: taranan 58.918 gen modeli arasından, RVD ağırlık matrisi skoruna dayalı sıralama; TcS: işaretli transkripsiyonal başlangıç alanı; n.p: mevcut değildir; TIS: translasyonel başlangıç alanı. Konumlar hedef alanın 5' ucuna göredir. Q değerleri aşılama sonrasında beş defaya kadar gerçekleştirilen, dört defa tekrarlanan bir karşılaştırma içindir; misli değişiklik 96 saatteki değişikliktir (PLEXdb kayıt OS3).
- 10 Örnek 2 - TALEN'ler mayada işlev görebilmektedir
- Plazmitin yapısı:* TAL efektör AvrBs3'ün protein kodlama dizisi BamHI ile bir plazmitten parçalanma yoluyla elde edilmiştir. Başlıca tekrar alanını kodlayan bir DNA fragmanı SphI ile kesip çıkarılmıştır. AvrBs3'ün aminoasit dizisi GENBANK Kayıt No. P14727 ve SEQ ID NO: 12 (ŞEK. 3) altında bulunmaktadır ve nükleik asit dizisi Kayıt No. X16130 ve SEQ ID NO:13 (ŞEK. 4) altında bulunmaktadır. ŞEK. 4'te, BamHI ve SphI alanları kalın ve alt çizili olmaktadır. AvrBs3 BamHI ve SphI fragmanları, FokI nükleaz alanını kodlayan dizilere bitişik nükleaz ekspresyon vektörü pDW1789_TAL'a klonlanmıştır (ŞEK. 5). AvrBs3 hedef alanını hedef raportör plazmitine klonlamak için, aralarında bir 18 bp aralayıcı dizisine sahip, evrik bir oryantasyonda düzenlenmiş iki AvrBs3 tanıma alanı içeren iki komplementer DNA oligolar, anılan sıraya göre 5' ve 3' uçlarında BglI ve SpeI çıkıntılarıyla sentezlenmiştir. 6, 9, 12 ve 15 bp aralayıcı uzunluğuna sahip tanıma alanlarına sahip başka raportör plazmitleri oluşturulmuştur. Tavlanan DNA oligoları raportör plazmiti pCP5'e (ŞEK. 6) klonlanmıştır ve bu da Bgl II ve SpeI ile parçalanmıştır.
- 30 **Maya testi:** Hedef raportör plazmitler YPH499 maya suşuna (bir MAT suşu) dönüştürülmüştür ve transformantlar triptofan içermeyen sentetik, tam ortamda (SC-W) seçilmiştir. TALEN ekspresyon plazmiti YPH500'e (bir MAT a suşu) dönüştürülmüştür ve transformantlar histidin içermeyen SC ortamında (SC-H)

kaplanmıştır. Hedef raportör plazmitleri taşıyan maya kolonileri ve TALEN ekspresyon plazmitleri taşıyan koloniler geceleyin, anılan sıraya göre, sıvı SC-W ve SC-H ortamında 30°C'de kültüre edilmiştir. Kùltürler aynı OD⁶⁰⁰'e ayarlanmıştır ve her birinden 5 200 µl, 200 µl YPD ortamına karıştırılmıştır. Karışım, iki maya suşu türünün çiftleşmesine izin vermek için 4 saat süresince 30°C'de inkübe edilmiştir. Karıştırılan kùltür ve geceleyin veya OD₆₀₀ 0,5-1 aralığına ulaşana kadar 30°C'de 5 ml SC-W-H ortamında hız azaltılmıştır ve yeniden süspanse edilmiştir. Hücreler 10 toplanmıştır ve kantitatif p-galaktosidaz testleri tarif edilen şekilde gerçekleştirilmiştir (Townsend et al. (2009) Nature 459:442-445).

Sonuçlar: TAL-Fok I füzyonu, TAL DNA tanıma alanını ve spesifik olmayan FokI DNA bölünme alanını içeren alana özgü bir nükleaz 15 olmaktadır. TAL DNA tanıma alanı, farklı DNA dizilerini bağlamak üzere işlenebilmektedir. Bu tarifnamede Örnek 1'de tarif edildiği gibi, TAL efektörleri için DNA tanıma spesifitesi için yeni bir sınıf DNA bağlayıcı alan çözülmüştür. Spesifik olarak, TAL efektörlerinin DNA bağlayıcı alanı, spesifik DNA dizilerini 20 tanıyabilen ve onları bağlayabilen çeşitli sayıda tandem, 34-aminoasit tekrarı içermektedir. Tekrarların aminoasit dizileri, tekrarların 12. ve 13. konumlarında iki bitişik oldukça değişken kalıntı haricinde korunabilmektedir. Bu konumlar birlikte bir tekrardan bir nükleotide DNA bağlayıcı alanda bireysel 25 nükleotidleri belirtmektedir, TALEN'lerin mimarisi ŞEK. 7'de gösterilmektedir. TALEN'ler dimer görevi görmektedir ve tasarlanmış TAL DNA tanıma tekrarlarından oluşan her bir monomer FokI endonükleazından spesifik olmayan bir bölünme alanına bağlı olmaktadır. DNA tanıma tekrarları ilgilenilen bir genomdaki hedef 30 DNA dizilerini bağlamak üzere tasarlanmış olabilmektedir. TAL nükleaz monomerleri, bir aralayıcı dizi aracılığıyla ayrılmış olan iki DNA yarım alanlarından birine bağlanmaktadır. Bu aralık, FokI monomerlerinin dimer oluşturmasını ve yarı alanların arasında aralık dizisinde bir çift sarmal DNA kırığının

(DSB) oluşturmasını mümkün kılmaktadır.

TAL efektör DNA tanıma alanının potansiyelini incelemek için, doğal TAL efektörlerinin FokI nükleaz alanına bağlandıklarında nükleazlar olarak işlev gösterip gösteremediklerini belirlemek için deneyler gerçekleştirilmiştir. Maya bazlı test bir TAL nükleaz ekspresyon yapısı ve bir hedef raportör yapısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ŞEK. 5'te gösterildiği gibi, nükleaz ekspresyonu yapısının temeli bir FokI nükleaz alanını ve maya TEF1 promotörünün kontrolü altında bir N-terminal nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içermektedir. Çeşitli TAL efektörlerinin klonlanmasını hızlandırmak için FokI nükleaz alanı ve NLS motifi arasında birden fazla restriksiyon alanı konumlu olmaktadır. Hedef raportör yapısı, ŞEK. 6'da gösterilen şekilde kodlama dizisinin 125 bp çoğaltılmasıyla bozulmuş bir lacZ raportör genine sahip olmaktadır. Çoğaltma TAL DNA bağlayıcı alanlar tarafından tanınan bir URA3 geni ve hedef dizisini (iki yarı alan ve bir aralayıcı diziden oluşan) tavlamaaktadır. TALEN'in hedef alana bağlanması ve DNA çift sarmal kırığı (DSB) oluşturması durumunda, mayadaki bu tür kırıklar ağırlıklı olarak çoğaltılan lacZ dizilerinin arasındaki homolog rekombinasyon aracılığıyla tekli suş tavlama ile tamir edilmektedir (Haber (1995) Bioessays 17:609). Rekombinasyon, işlevsel bir lacZ geninin yeniden oluşturulması ve URA3'de kaybın gerçekleşmesiyle sonuçlanmaktadır (bu, fluoroorotik asit direncini kazandırmaktadır). TALEN'lerin nispi bölünme aktivitesi, lacZ enzim aktivitesinin belirlenmesiyle ölçülmektedir.

Bu araştırmalarda, SEQ ID NO: 16'da (ŞEK, 8) belirtilen şekilde merkezi bir nükleaz tekrar bölümüne sahip olan doğal TAL efektör AvrBs3 nükleaz ekspresyon vektörüne klonlanmıştır ve 18 bp aralayıcı dizisine sahip AvrBs3 hedef bölgeleri (ters oryantasyonda düzenlenmiş bağlayıcı iki alan) hedef raportör vektörüne klonlanmıştır. Maya testi, ŞEK. 9'da gösterilen ve yukarıda tarif edilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar,

maya hücrelerinden hem AvrBs3 nükleaz plazmitle, hem de hedef raportör plazmitle dönüştürülen lacZ aktivitesinin sadece hedef raportör plazmiti (ŞEK. 10) içeren kontrol maya hücrelerine göre kayda değer oranda daha yüksek (15,8 misli) olduğunu göstermiştir. Sadece ağırlıklı olarak tekrar alanını kodlayan SphI fragmanı ile gerçekleştirilen nükleaz füzyonlarıyla herhangi bir aktivite gözlemlenmemiştir. Bu durum, TALEN aktivitesi için DNA bağlayıcı alanı dışında dizilerin gerekli olduğunu göstermektedir. 6 il 9 bp arasında aralayıcı uzunluğuna sahip raportör plazmitler de aktivite sergilememiştir. Bu durum da FokI'in dimer oluşturmaya izin vermek için iki bağlayıcı alan arasındaki boşluğun kritik olduğunu göstermektedir. Bu veriler, AvrBs3 TAL nükleazın, onun mayadaki aynı kökten hedef dizisini bölen bir alana spesifik nükleaz olarak işleyebileceğini göstermektedir.

Örnek 3 - Özel TALEN'ler için TAL efektör tekrarlarının modüler düzenlenmesi

Dört ayrı bireysel TAL efektör tekrarlarının her birinin 102 baz çiftine tekabül eden, her biri farklı bir nükleotidi belirten tamamlayıcı oligonükleotitler 4 tekli, 16 çift ve 64 üçlü tekrar modülleri elde etmek için, standart restriksiyon parçalanması ve ligasyon teknikleri (ör: ŞEK. 11 'de gösterilen gibi) kullanılarak tüm devşirimlerde bireysel olarak ve 2 veya 3 tekrarlı kombinasyonlar halinde sentezlenmektedir, tavlanmaktadır ve bir yüksek kopya bakteriyel klonlama vektörüne klonlanmaktadır. Arzu edilen TAL efektör kodlama dizisi, karakteristik nihai yarım tekrar dışında merkezi tekrar alanından yoksun olan talc geninin bir kesik biçimini içeren bir Gateway-hazır yüksek kopya bakteriyel klonlama vektörüne uygun modüllerin sıralı bir şekilde katılmasıyla düzenlenebilmektedir. Örneğin, bir 18 tekrarlı TAL efektör kodlama dizisi, 5 üçlü modül ve 1 çift modülün kesik talc vektörüne sıralı olarak katılmasıyla düzenlenebilmektedir.

Örnek 4 - TAL efektör tekrarlarının modüler düzenlemesi için bir sistem

Özel TAL efektör kodlayıcı genler üretmek için plazmitler ve yöntemler geliştirilmiştir. TAL efektörlerinin işlevsel spesifitesi, bu tarifnamede tarif edilen şekilde tekrarlardaki RVD'ler tarafından belirlenmektedir; tekrarlardaki ve proteinlerin diğer alanlarındaki diğer polimorfizmler nadir olmaktadır ve işlevsel spesifiteye istinaden önemsiz olmaktadır. Böylece, rastgele bir TAL efektör geninin tekrar alanını arzu edilen RVD'leri içeren tekrarlarla değiştirerek özel TAL efektör genleri üretilmiştir. RVDTerin dışındaki tekrar dizileri bir konsensüs dizisiyle eşleşmiştir (aşağıda açıklanmıştır). TAL efektör tekrarlarını kodlayan DNA fragmanları bir, iki veya üç tekrarı kodlayan modüllerin içerisine sırasıyla düzenlenmiştir ve modüller, içerisinden orijinal tekrarların çıkarıldığı bir TAL efektör geninin içerisine klonlanmıştır. Son (yarım) tekrar haricinde, kodlanan tekrarların her biri LTPDQVVAIASXXGGKQALETVQRLLPVLCQDHG (SEQ ID NO: 18; ŞEK. 12A) dizisine sahip olmuştur. Son (yarım) tekrar LTPDQVVAIASXXGGKQALES (SEQ ID NO: 20; ŞEK. 12B) dizisine sahip olmuştur. Her iki dizide, "XX" RVD'nin konumunu belirtmektedir. Modüler tekrarlarda kullanılan RVD'ler anılan sıraya göre A, C, G ve T'ye bağlanmayı belirten NI, HD, NN ve NG olmuştur. Aşağıda tarif edilen deneylerde *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* suşu BLS256'nm tallic geni, tekrarları çıkarılmış olarak, özel TAL efektör genlerini oluşturmak için "temel" olarak kullanılmıştır.

Bu tarifnamede tarif edilen yöntem beş bileşen içermiştir: (1) tekli tekrar başlatıcı plazmitlerinin üretimi; (2) tekli tekrar modülü plazmitlerinin üretimi; (3) çoklu tekrar modüllerinin üretimi; (4) bir-, iki- ve üç tekrar modülü plazmitlerinin tam bir grubunun üretimi ve (5) özel TAL efektör kodlama dizilerinin düzenlemesi.

Tekli tekrar başlatıcı plazmitlerini üretmek için talc geni MscI ile parçalanmıştır ve birinci tekrarın birinci kısmı ve sonuncu, kesik kısmın sonuncu kısmı dışında tekrar bölgesinin tamamını çıkarmak için bağlanmıştır ve bunun sonucunda pCS487 olarak belirtilen plazmit elde edilmiştir (ŞEK. 13). Elde edilen gen RVDN1'yı kodlamıştır ve çoğu TAL efektör geninde olduğu gibi tekrar bölgesini tavlayan iki SphI alanı içermiştir. Gen herhangi bir XhoI alanı içermemiştir.

Bunun ardından, kodon 19 ve 20 üzerinde merkezli özel bir XhoI alanını içeren özel bir PspXI alanı oluşturmak için pCS487'ye translasyonel olarak sessiz bir mutasyon tanıtılmıştır. Mutasyon, kodon 18-21 için, her ikisi de aminoasit sekansı ALES'i (SEQ ID NO:22) kodlayan orijinal ve değiştirilmiş nükleotid dizilerini (anılan sıraya göre SEQ ID NO:21 ve SEQ ID NO:23) gösteren ŞEK. 14'te gösterilmektedir. Elde edilen plazmit, pCS489 olarak anılmaktadır.

İlave mutajenez aracılığıyla, anılan sıraya göre pCS490, pCS491 ve pCS492 olarak belirtilen plazmitler oluşturmak için RVD'ler HD, NN ve NG ile üç ek yapı oluşturulmuştur. Modifiye edilmiş tekrar alanını kapsayan SphI fragmanı pCS489, pCS490, pCS491 ve pCS492'den, Gateway giriş vektörü pENTR-D'de (Invitrogen, Carlsbad, CA), tekrar alanı olmadan talc'nin sadece N- ve C-terminal kısımlarını kodlayan, pCS488 (ŞEK. 15) olarak belirtilen kanamisin dirençli plazmite aktarılmıştır. Bu aktarım, anılan sıraya göre, pCS493 (ŞEK. 16), pCS494, pCS495 ve pCS496 olarak belirtilen tekli tekrar başlangıç plazmiti eri sağlamıştır. Kesik tekrardaki PspXEXhoI alanı bu plazmitlerde özel olmaya devam etmiştir. pCS488 ve onun türevlerinin her birindeki TAL efektör geninin önünde, anılan sıraya göre prokaryot ve ökaryotlarda verimli translasyon için Shine-Dalgarno ve Kozak dizileri yer almaktadır.

Bunun ardından tekli tekrar modülü plazmitleri oluşturulmuştur.

Seçilen RVD Terin (NI, HD, NN ve NG) her biri için bir plazmit oluşturulmuştur. Her plazmit, bir PspXI alanına bağlandığında bir XhoI ile yeniden düzenlenen ancak bir PspXI alanıyla yeniden düzenlenmeyen bir 5' uyumlu kohezif uca ve hem bir XhoI, hem de

5 bir PspXI alanıyla yeniden düzenlenen bir 3' uyumlu kohezif uca sahip olmuştur. Plazmitler çıkıntıya sahip tavlanan sentetik, komplementer oligonükleotidlerin (şEK. 17 A) pBluescript SK'nin PspXEXhoI alanına klonlanmasıyla üretilmiştir - bunun sonucunda, anılan sıraya göre, pCS502 (şEK. 17B), pCS503, pCS504 ve pCS505

10 olarak belirtilen plazmitler elde edilmiştir. Her bir plazmit, özel yeniden düzenlenmiş PspXI alanında tekli tekrar modülünün 3' ucunda ek tekrarların veya tanıtımını veya yeniden düzenlenen XhoI alanlarını kullanarak tekrar modülünün kesilerek alınmasını mümkün kılmıştır.

15 NI, HD, NN ve NG için birer tane olmak üzere ek tekli tekrar modülleri üretilmiştir. Her biri bir PspXI alanına bağlandığında bir PspXI veya XhoI alanını yeniden düzenlemeyen bir 5' uyumlu kohezif uca, hem XhoI, hem de PspXI alanını yeniden düzenleyen bir 3' uyumlu kohezif uca ve dhili MscI alanını yok eden

20 translasyonel olarak sessiz bir nükleotid ikamesine sahip olmuştur (şEK. 18A). Bu modüller çıkıntıya sahip sentetik, komplementer oligonükleotidlerin tavlanmasıyla üretilmiştir. Ek tekli tekrar modüllerinden herhangi birinin tekli bir tekrar modülü plazmitinin (pCS502, pCS503, pCS504 veya pCS505) zel

25 PspXI/XhoI alanına bağlanması 5' bağlantı noktasında yeni herhangi bir XhoI alanı ortaya çıkarmamıştır, ancak zel PspXEXhoI alanında restorasyon söz konusu olmuştur; bunun sonucunda, plazmitler PspXI ile kesmeyle daha fazla ek tekrarların katılması için doğrusal duruma getirilebilmektedir.

30 Bu prosesin yinelemesi, birden fazla tekrar içeren modülleri ortaya çıkarmıştır (şEK. 18B). İlaveten, birden fazla tam tekrar modülünün her biri XhoI kullanılarak kesilerek anılabilmemiştir. MscI alanının ek tekli tekrar modüllerinde yok edilmesi nedeniyle, başlangıç tekrarındaki MscI alanı özel olmaya devam

etmiştir ve çoklu tekrar modülünün müteakip alt klonlanması üzerine oryantasyonun kontrol edilmesi fayda sağlamıştır.

5 Ek tekli tekrar modülleri, tekli tekrar modül plazmitlerinin yanı sıra olası tüm bir-, iki- ve üç-tekrarlı modüllerin tam bir grubunu oluşturmak için tekli tekrar modül plazmitlerine tekrarlanarak klonlanmıştır ve böylece toplamda pCS502 ile pCS585 arasında 84 plazmit elde edilmiştir (ŞEK. 19). Üçten fazla tekrar (ör: dört, beş, altı, yedi, sekiz, dokuz, on veya daha fazla tekrar) içeren modüller aynı şekilde üretilmiştir.

10 Bunun ardından, özel bir TAL efektör geni oluşturmak için tallo "temele herhangi bir tekrar sırası düzenlemek için bir yöntem tasarlanmıştır. Yöntem, aynı zamanda ŞEK. 20'de tasvir edilen aşağıdaki adımları içermiştir:

15 (1) Arzu edilen tekrara sahip bir tekli tekrar başlatıcı plazmiti seçmek (anılan sıraya göre RVD NI, HD, NN veya NG'yi kodlayan pCS493, pCS494, pCS495 veya pCS495);

(2) plazmiti PspXI ile doğrusal duruma getirmek;

20 (3) uygun modül plazmitinden (pCS502 ile pCS585 arasında) sıradaki tekrar (tekrarlar) için modülü XhoI kullanılarak izole etmek;

(4) bağlanma;

(5) MscI ile parçalanmanın oryantasyonu kontrol etmek ve bir vektör bazlı primer kullanılarak 3 ' ucundan diziyi doğrulamak ve

25 (6) tüm tekrarlar düzenlenene kadar adım 2-5'i tekrarlamak.

Örnek 5 - TALEN'lerin modüler düzenlemesi için plazmit kütüphanesi

30 TALEN tekrarlarının bu tarifnamede tarif edilen şekilde düzenlenmesi (ör: ŞEK. 20'de tasvir edilen adımları kullanarak) artan sayıda tekrar içeren birden fazla ara plazmit ile sonuçlanmaktadır. Bu plazmitlerin her biri, TALEN'lerin modüler

düzenlemesi için bir plazmit kütüphanesinin (pMATTar) üretildiği şekilde saklanmaktadır. Örneğin, ŞEK. 21A ve 21B tekrar modüllerinin, gösterilen nükleotid dizilerini hedefleyen TAL endonükleazlarının oluşturulmasındaki düzenlemesini tasvir etmektedir. ŞEK. 21A'da, pCS519, pCS524, pCS537, pCS551, pCS583 ve pCS529 olarak belirtilen plazmitlerden tekrar modülleri pCS493 olarak belirtilen başlatıcı plazmitindeki diziye sıralı olarak eklenmektedir ve pMAT55, pMAT56, pMAT57, pMAT58, pMAT59 ve pMAT60 olarak belirtilen plazmitler elde edilmektedir. ŞEK. 21B'de pCS530, pCS533, pCS522 ve pCS541 olarak belirtilen plazmitlerden tekrar modülleri pMAT1 olarak belirtilen plazmitteki diziye sıralı olarak eklenmektedir ve pMATöl, pMAT62, pMAT63 ve pMAT64 olarak belirtilen plazmitler elde edilmektedir.

15 Örnek 6 - Özel TALENlerin üretimi ve test edilmesi

TAL DNA tanımlama alanı, Örnek 4 ve 5'te tarif edilen sistemi kullanarak belirli DNA hedeflerini (ŞEK. 22A) tanıyan ve bölen TALEN'leri oluşturmak için kullanılmıştır, TALEN işlevini değerlendirmek için, LacZ aktivitesinin DNA bölünmesini bir göstergesi görevini gördüğü bir maya testi uyarlanmıştır (Townsend et al., yukarıda geçen). Bu testte, bir hedef plazmiti ve bir TALEN ekspresyon plazmiti çiftleşme aracılığıyla aynı hücrede bir araya getirilmektedir. Hedef plazmiti, kodlama sekansının 125 bp çoğalmasını içeren bir lacZ raporör genine sahip olmaktadır. Çoğalma, belirli bir TALEN tarafından tanınan bir hedef alanını tavlamaktadır. Hedef alanında bir çift sarmal DNA kırığı oluştuğunda, bu, çoğaltılan diziler arasında tek sarmal tavlama aracılığıyla onarılmaktadır ve bu, ekspresyonu ölçülebilir bir okuma sağlayan standart β -galaktosidaz testleri kullanılarak ölçülebilen işlevsel bir lacZ geni üretmektedir (ŞEK. 22A). Bu testin bir SFN'nin NHEJ tarafından kromozal mutasyonlar oluşturma veya yüksek ökaryotlarda gen düzenleme için homolog rekombinasyonu stimüle etme yeteneği için iyi bir gösterge olduğu gösterilmiştir (Townsend et al., yukarıda geçen

ve Zhang et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:12028-12033).

5 iyi karakterize edilen iki TAL efektör kullanılmıştır - biber patojeni *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'dan AvrBs3 ve piring patojeni *X. oryzae* pv. *oryzae*'den PthXol (Bonas et al. (1989) Mol. Gen. Genet. 218:127-136; and Yang et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:10503-10508). AvrBs3'ün aminoasit dizisi GENBANK Kayıt No. P 14727 ve SEÇ ID NO: 12 (ŞEK. 3) altında ve nükleik asit dizisi Kayıt No. X16130 ve SEÇ ID NO: 13
10 altında bulunabilmektedir (ŞEK. 4). PthXol'in aminoasit dizisi GENBANK Kayıt No. ACD58243 ve SEÇ ID NO:31 altında bulunabilmektedir (ŞEK. 23) ve nükleik asit dizisi Kayıt No. CP000967, gen No. 6305128 ve SEÇ ID NO:32 altında (ŞEK. 24) bulunabilmektedir. PthXol'in GENBANK Kayıt No. ACD58243
15 altındaki aminoasit dizisi, başlangıç kodonunun yanlış belirtmeler nedeniyle N-terminusunda kesik olmaktadır. Dizinin tamamı ŞEK. 23 'te sunulmaktadır.

Hem AvrBs3, hem de PthXol'in tekrar alanları tamamen korunan bir SphI fragmanının içerisinde kodlanmaktadır (ŞEK. 4 ve 24). Her
20 iki TAL efektör kodlama geni aynı zamanda tekrar alanı ve öncesindeki 287 aminoasidi veya sonrasındaki 231 aminoasidi için kodlama dizisini kapsayan bir BamHI restriksiyon fragmanına sahip olmaktadır (ŞEK. 4 ve 24; ayrıca, ŞEK. 22A). BamHI fragmanı TAL efektör transkripsiyonal aktivasyon alanından yoksundur. Hem
25 SphI fragmanları, hem de BamHI fragmanları, nükleaz ekspresyon vektörü pFZ85'te mevcut olan bir DNA fragmanı kodlayıcı FokEe bağlanmıştır (ŞEK. 25). AvrBs3 ve PthXol tarafından kodlanan FokI nükleazı ve BamHI fragmanları arasındaki füzyon proteinleri ŞEK. 26 ve 27'de sağlanmaktadır; SEQ ID NO: 33 ve 34.

30 FokI monomerlerinin bölünmesi için dimer oluşturması gerekmektedir, ancak iki DNA tanıma alanı arasındaki uygun aralayıcı uzunluğu belirsiz olmuştur. Çinko parmak testlerinin

bir 4-7 aminoasit bağlayıcı aracılığıyla FokEde ayrıldığı ZFN'ler için iki tanıma alanı arasındaki tipik aralayıcı 5-7 bp olmaktadır (Handel et al. (2009) Mol. Ther. 17:104-111). Örneğin, burada kullanılan BamHI TALEN yapılarındaki FokEde tekrar alanını 235 aminoasit ile ayrılması nedeniyle, BamHI ve SphI yapıları için çeşitli aralayıcı uzunlukları (6, 9, 12, 15 ve 18 bp) kullanılmıştır. Pozitif bir kontrol olarak, fare transkripsiyon faktörü Zif268'den (Porteus ve Baltimore (2003) Science 300:763) türetilen bir DNA bağlayıcı alana sahip iyi karakterize edilen bir çinko parmak nükleazı kullanılmıştır. Negatif kontroller olarak, TAL efektör alanları katalitik olarak inaktif bir FokI varyantına bağlanmıştır veya konjuge olmayan DNA hedeflerine karşı test edilmiştir.

200 ml gecelik kültürde TALEN ekspresyon veya hedef plazmit içeren haploit hücre türleri 30°C'de YPD ortamında çiftleştirilmiştir. 4 saat sonrasında YPD ortamı 5 ml selektif ortamla değiştirilmiştir ve geceleyin 30°C'de inkübe edilmiştir. Çiftleştirilen kültürler çözündürülmüştür, ONPG substrat eklenmiştir ve absorbans bir 96- gözenekli plaka okuyucu kullanarak 415 nm'de ölçülmüştür (Townsend et al., yukarıda geçen). B-galaktosidaz seviyeleri substrat bölünme hızının bir fonksiyonu olarak hesaplanmıştır. İki tanıma alanını ayıran bir 15 bp aralayıcıya sahip hedef raportör yapıları ile elde edilen sonuçlar ŞEK 22B'de gösterilmektedir. Tekrar dizilimini başlıca kodlayan SphI fragmanından türetilen tüm nükleaz ekspresyon yapıları aktive sergilememiştir ve bu da işlev açısından tekrar testlerindeki ek olarak aminoasit dizilerinin gerektiğini göstermektedir (ŞEK. 22B). PthXol TALEN aktivitesi ZFN pozitif kontrolüne benzer olmuştur. İşlevsel FokI alanı için gerekli olan aktivite belirli bir TALEN tarafından tanınan DNA hedefi için spesifik olmuştur.

Ayrıca, FokI'in en verimli şekilde dimer oluşturmasını mümkün kılan aralayıcı uzunluklarını belirlemek için TAL efektör

bağlayıcı alanları arasındaki çeşitli mesafeleri (12 ve 30 bp arasında 11 adet uzunluk varyantı) ölçmek için de deneyler gerçekleştirilmiştir (ŞEK. 28A). Her iki enzim iki uzunluk optimumu sergilemiştir - bunlardan biri 15 bp'de ve diğeri ya 21
5 bp (AvrBs3), ya da 24 bp (PthXol) olmuştur. PthXol için, test edilen 13 bp ve üzeri tüm aralayıcı uzunlukları için aktivite gözlemlenmiştir. Ancak AvrBs3 için bazı aralayıcı uzunlukları herhangi bir aktivite sergilememiştir, bu da aralayıcı uzunluklarının belirli TALENter için kritik olduğunu
10 göstermektedir.

Yukarıdaki deneyler, aralayıcının her iki tarafına karşılıklı olarak yerleştirilen aynı tanıma dizilerini birbirlerine bağlayan homodimerik TALENterin aktivitesini test etmiştir. Bu tür palindromik alanların genomik hedeflerde doğal oluşumlu
15 olması pek olası olmadığı için TALENterin heterodimer olarak işlev gösterebilip gösteremeyeceğini test etmek için deneyler gerçekleştirilmiştir. AvrBs3 ve PthXol tanıma alanları bir 15 bp aralayıcının her iki tarafına baştan sona oryantasyonda yerleştirilmiştir. AvrBs3 ve PthXol TALENterinin bireysel
20 aktivitesi ve Zif268'in onların ilgili hedeflerinin üzerindeki aktivitesi kontroller olarak ölçülmüştür. Negatif bir kontrol olarak, heterodimerik alan için sadece hedef alanı plazmiti içeren bir maya kültürü LacZ aktivitesi için test edilmiştir. Heterodimerik TALEN'in elde edilen aktivitesi, iki homodimerik
25 enzimle görülen aktivitelerin ortalamasının civarında olmuştur (ŞEK. 28B).

Tekrar alanlarının TALEN'leri rastgele kromozal dizilere hedeflemek için düzenlenebilip düzenlenemeyeceğini test etmek için daha önce ZFN'ler ile mutajenez için hedeflenen iki gen
30 seçilmiştir - Arabidopsis'ten ADH1 ve zebra balığından gridlock (Foley et al. (2009) PLoS One 4:e4348 ve Zhang et al., yukarıda geçen). Başında bir 5' T olan ve Moscou ve Bogdanove (yukarıda geçen) tarafından belirlenen TAL efektör bağlayıcı alanlantıkine

benzer bir nükleotid bileşimine sahip 12-13 bp dizileri için bir tarama gerçekleştirilmiştir. ADH1 ve gridlock'ta bu tür bölgeler ortalama her 7-9 bp'de bir gerçekleştirilmiştir. ADH1 'de (kromozal gen dizisinin 360, 408, 928 ve 975. konumlarında) dört 12 bp alanı ve gridlock'ta (kromozal gen dizisinin 2356. konumunda; ŞEK. 29A) bir 13 bp alanı seçilmiştir. TAL efektör alanları, doğal TAL efektörlerinden en bol olarak mevcut olan RVDTer kullanılarak (A için NI, C için HD, G için NN ve T için NG) bu hedefleri tanımak için yapılandırılmıştır. Özel TALENler oluşturmak için bu RVDTeri içeren tekrarlar bireysel olarak sentezlenmiştir ve Örnek 4 ve 5'te tarif edilen şekilde bir, iki veya üç tekrardan oluşan modüllerin içinde düzenlenmiştir. Bu modüller sıralı olarak, orijinal tekrarların çıkarıldığı tallo geninin (Moscou ve Bogdanove, yukarıda geçen) bir türevine bağlanmıştır ve işlenen bu TAL efektörlerinden BamHI fragmanları pFZ85'te FokI'in katalitik alanını kodlayan dizilere bağlanmıştır (ŞEK. 25B). Arabidopsis ve zebra balığı gridlock geninden ADH1 'e hedeflenen beş özel TALEN oluşturulmuştur.

Elde edilen özel TALENler, heterodimerik TALENlerin doğal oluşumlu DNA hedeflerinde bölünmeyi yönlendirmek için yapılandırılmalarının gerektiği not edilse de, maya testinde homodimerik TALENler olarak test edilmiştir (yani, aynı DNA bağlayıcı alan bir 16-18 bp aralayıcının her iki tarafında ters oryantasyonda çoğaltılmıştır). Aralayıcı uzunlukları sıradaki komşu (ve karşıt) aday alanın 3' ucundan 15 bp mesafeye en yakın mesafeye dayalı olarak seçilmiştir. ADH1-360-12, ADH1-408-12r için 16 bp aralayıcılar ve ADH1-928-12, ADH1-975-12r ve gridlock-2356-13r için 18 bp aralayıcılar kullanılmıştır. Maya testi yukarıda tarif edilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

ADH1-360-12 ve gridlock-2356-13r TALEN için sağlam nükleaz aktivitesi gözlemlenmiştir (ŞEK. 29B). ADH 1-928-12 TALEN makul, ancak yine de negatif kontrollerin kayda değer oranında üzerinde olan aktivite sergilemiştir. Pozitif sonuç sağlayan her biri

TALEN için nükleaz aktivite aynı kökten hedef için spesifik olmuştur. Bu sonuçlar, yeni, işlevsel TALEN'lerin özelleştirilmiş tekrar alanlarıyla düzenlenebileceğini göstermektedir.

5

Örnek 7 - Doğal oluşundaki hedef ve TAL efektör çiftleri nükleotidde ve RVD bileşiminde genel ve konumsal eğilim sergilemektedir

10 Moscou ve Bogdanove {yukarıda geçen} tarafından analiz edilen eşleştirilen 20 hedef çifti ve TAL efektörleri nükleotid veya RVD sıklıkları üzerinde genel bileşim eğilimi ve konumsal etkiler için değerlendirilmiştir. Alanların (pozitif suştaki) genel olarak A ve C bakımından zengin ve G bakımından zayıf oldukları gözlemlenmiştir. Ortalama yüzde A $31 \pm 16\%$ (1 standart sapma) olmuştur. Ortalama yüzde C $37 \pm 13\%$ olmuştur. Ortalama yüzde G $9 \pm 8\%$ ve ortalama yüzde T $22 \pm 10\%$ olmuştur. Hizalamaların uzunluk bakımından farklılık göstermesi nedeniyle konumsal etkilerin analizi her uçtaki beş konumla sınırlandırılmıştır. İlginç bir şekilde, hedef dizilerindeki eğilim 1. ve 3. konumda A için ve N konumunda T'ye karşı ve muhtemelen 2'de T için ve belirgin olmuştur. G N-1 konumunda özellikle nadir olmuştur. Bu eğilim, efektörlerdeki RVD'lerin eşleştirilmesiyle yansıtılmıştır; NI en sık 1. ve 3. konumda gözlemlenmiştir, 1. konumda hiç NG gözlemlenmemiştir ve NG 25 neredeyse her zaman konum N'de, NN ise nadiren konum N-1 'de gözlemlenmiştir (ŞEK. 30). Örnek 8 - Özel TAL efektör tekrar dizilimlerinin hızlı düzenlemesi ve klonlanması için yöntemler ve reaktifler

30 Golden Gate klonlama yöntemi [Engler et al. (2008), yukarıda geçen ve Engler et al. (2009), yukarıda geçen] Tip TIS restriksiyon endonükleazlarının (ör: Bsal) çoklu DNA fragmanlarının eşzamanlı olarak sıralı olarak bağlanması için özel çıkıntılar oluşturmak için onların tanım alanlarının dışarısını kesme yeteneğinden faydalanmaktadır. Bu yöntem 35 kullanılarak birden fazla DNA fragmanı bir dizilime spesifik bir

sırada bağlanabilmektedir ve tekli bir reaksiyonda arzu edilen hedef vektörün içine klonlanabilmektedir (ŞEK. 31).

Özel TAL efektör kodlayıcı dizilimi düzenlemek için bir yöntem ve reaktifler Golden Gate sistemine dayalı olarak geliştirilmiştir, Bsal alanları bir TAL efektör tekrar kodlama dizisinin iki tarafından birine konumlandırıldığında, bölünme 4-bp çıkıntılarla tavlanan bir tekrar fragmanını salmaktadır. Bölünme alanının diziye spesifik olmaması nedeniyle, tekrar klonlan basamaklandırma aracılığıyla sıralı, tamamlayıcı çıkıntılarla (yapışkan uçlar) salınabilmektedir ve böylece çoklu tekrarlı dizilimin sıralı düzenlemesini mümkün kılabilir. 58 plazmitten oluşan bir kütüphane (ŞEK. 31A ve 32B), 10'a kadar tekrar biriminin eşzamanlı olarak "alt dizilimlere" düzenlenmesini, ardından da bu alt dizilimlerin bir, iki veya üçünün bir son kesik tekrarlarla birlikte bir tam, özel dizilime eşzamanlı olarak düzenlenmesini mümkün kılmak için üretilmektedir. Gruptaki her fragmanın bir tekrar modülünü dört en yaygın RVD'lerden (HD, NG, NI ve NN) farklı bir tanesiyle kodladığı, dört fragmandan oluşan on basamaklandırılmalı grup sentezlenmiştir ve toplam 40 plazmit elde edecek şekilde tetrasiklin direnç genini taşıyan bir vektörün içine klonlanmıştır. Her fragmanın en yaygın dört RVD'den farklı bir tanesini kodladığı, 20 aminoasitten oluşan, terminali kesik TAL efektör tekrarını kodlayan dört fragman daha sentezlenmiştir ve "son tekrar plazmitleri" olarak belirtilen dört plazmit daha elde etmek için spektinomisin direnç genini taşıyan farklı bir vektörün içine klonlanmıştır (ŞEK. 32A). Basamaklandırılmalı gruplardaki tüm fragmanlar, Bsal ile bölünmenin farklı yapışkan uçlara sahip fragmanları salmasını sağlayan şekilde Bsal alanlarıyla tavlanmaktadır ve uygun sırada düzenleme elde edilmektedir; diğer bir deyişle, tekrar modülü 1 için bir fragmanın 3' ucundaki çıkıntı sadece tekrar modülü 2 için fragmanın 5' ucundaki çıkıntı için komplementer olmaktadır, tekrar modülü 2'nin 3' ucundaki çıkıntı sadece tekrar modülünün

5' ucundaki çıkıntı için komplementer olmaktadır, vesaire. Son tekrar plazmitlerindeki fragmanlar alanlar için farklı bir Tip IIS restriksiyon endonükleaz Esp3I için tavlansaktadır. Aşağıda tarif edilen ek on dört plazmit düzenlenen alt dizilimleri almak için hedef vektörleri olarak oluşturulmuştur.

21 veya altında tekrara (son, kesik tekrar dâhil) sahip son dizilime düzenlenecek olan 10 tekrarlı birinci alt dizilimi almak için birinci hedef vektörü, plazmit pFUS_A oluşturulmuştur. pFUS_A, Bsal tarafından bölünmenin bir tarafta birinci tekrar modülünün 5' ucundaki çıkıntı için tamamlayıcı olan bir çıkıntı oluşturduğu ve diğer tarafta 10. tekrar modülünün 3' ucundaki çıkıntı için tamamlayıcı olan bir çıkıntı oluşturduğu şekilde yapılandırılmıştır. Bu tür bir son dizilime düzenlenmek üzere 10 veya altında tekrara sahip bir ikinci alt dizilim almak için hedef vektörü plazmitleri pFUS_B1, pFUS_B2, pFUS_B3, pFUS_B4, pFUS_B5, pFUS_B6, pFUS_B7, pFUS_B8, pFUS_B9 ve pFUS_B10, Bsal tarafından bölündüklerinde birinci tekrar modülünün 5' ucundaki çıkıntı ve ona karşılık gelen numaralandırılmış konum için tekrar modülünün 3' ucu için tamamlayıcı olan çıkıntılara sahip olacakları şekilde yapılandırılmıştır (ör: alt dizilimin 3' ucu için pFUS_B6 çıkıntısı 6. konum için dört tekrar modülü fragmanının çıkıntısıyla eşleşmektedir). pFUS_A ve pFUS_B plazmit serilerinde klonlanan dizilimler vektörde Esp3I alanları aracılığıyla tavlansmıştır ve Esp3I ile parçalanmayla salındıklarında, dizilimler onların tekrar bölgesinden yoksun bir TALEN'i kodlayan hedef vektör pTAL'ın içine kesilen son tekrar fragmanı ile birlikte sıra halinde bağlanmalarını mümkün kılan özel, tamamlayıcı çıkıntılara sahip olmaktadır. pTAL, Esp3I ile bölünmenin tekrar diziliminin bir uçta ilk on tekrar alt diziliminin 5' ucundaki çıkıntı için tamamlayıcı olan bir çıkıntı ve diğer uçta son kesik tekrar fragmanının 3' ucundaki çıkıntı için tamamlayıcı olan bir çıkıntı sayesinde doğru konuma ve doğru oryantasyonda yerleştirilmesini mümkün kılmaktadır

(ŞEK. 33).

22-31 tekrar içeren bir son dizilime düzenlenecek birinci ve ikinci on tekrar alt dizilimi almak için son iki hedef vektör plazmiti pFUS A30A ve pFUS A30B oluşturulmuştur. pFUS A30A ve pFUS A30B, Esp3I ile parçalanmanın, dizilimlerin sıralı bir şekilde bir pFUS_B'den Esp3I ile parçalanmaya benzer bir şekilde pTAL'ın içine salınan bir üçüncü dizilim ve bir son tekrar plazmitinden bir son kesik tekrar fragmanı boyunca bağlanabildiği şekilde uygun komplementer çıkıntılarla dizilimleri salacak şekilde oluşturulmaktadır (ŞEK. 32).

Tüm hedef vektörler, rekombinantların mavi-beyaz taramasını mümkün kılacak şekilde Tip IIS restriksiyon endonükleaz alanları arasında klonlanmış LacZ genine sahip olmaktadır. Ampisilin direnci için bir gen taşıyan pTAL haricindeki tüm hedef vektörleri spektinomisin direnci için bir gen taşımaktadır.

Bu reaktifleri kullanan özel bir TAL efektör tekrar dizilimini hızlı bir şekilde oluşturmak için aşağıdaki yöntem oluşturulmuştur. Birinci adımda, gerekli on veya daha fazla tekrardan oluşan alt dizilimler için uygun bireysel RVD modülü plazmitleri bir tüpte uygun hedef vektörle karıştırılmaktadır. T4 DNA ligazı ve Bsal endonükleaz eklenmektedir ve reaksiyon bir PCR makinesinde iki enzim için ilgili optimal sıcaklıklar olan 37°C'de 5 dakikalık ve 16°C'de 10 dakikalık 10 çevrim süresince inkübe edilmektedir. Reaksiyon karışımı bunun ardından in vivo rekombinasyon aracılığıyla daha kısa, eksik dizilimler içeren klonlanmayı önlemek için tüm lineer dsDNA fragmanlarını hidrolize etmek için PLASMID-SAFE™ nükleaz ile işlenmektedir ve bunun ardından karışım, kimyasal olarak kompetent E. coli hücrelerini dönüştürmek için kullanılmaktadır. Elde edilen rekombinant plazmitler izole edilmektedir ve doğru yapılar konfirme edilmektedir. Bunun ardından, ikinci adımda, birinci adımda konfirme edilen plazmitler uygun son tekrar plazmit ve

pTAL ile karıştırılmaktadır ve birinci adımda olduğu gibi parçalama ve ligasyon reaksiyon çevrimi gerçekleştirilmektedir. Son olarak, E. coli'ye reaksiyon ürünleri eklenmektedir ve tam uzunluktaki, son dizilim yapısı izole edilmekte ve konfirme edilmektedir. Protokol bir kişi tarafından bir hafta içerisinde tamamlanabilmektedir.

Tablo 4A'da TALEN'ler 85, 102 ve 117'nin yanı sıra aşağıdaki Örnek 14'te tarif edilen TALEN'ler HPRT-3254-17 ve HPRT-3286-20r için ekspresyon yapıları bu örnekte tarif edilen yöntem ve reaktifler kullanılarak oluşturulmuştur.

pTAL'a klonlanan tekrar dizilimleri tekrar bölgesini tavlayan korunan SphI restriksiyon endonükleaz alanları kullanılarak diğer TAL efektör gen içeriklerine kolayca alt klonlanmaktadır.

Örnek 9 - Özel TALEN verisi "kurallar" için başlangıç desteğini ve RVD sayısı ve aktivitesi arasındaki korelasyonu göstermektedir

Örnek 6, onun özel DNA dizilerini tanımasını sağlamak için TALEN DNA bağlayıcı alanını değiştirmek için gerçekleştirilen deneyleri tarif etmektedir. Tarif edilen şekilde, bu özel TALEN'ler Arabidopsis ADH1 ve zebra balığı gridlock genlerindeki alanları tanımıştır. Ek özel TAL efektör DNA bağlayıcı alanlar sırf bu genlerdeki değil, aynı zamanda Arabidopsis ve zebra balığından telomerazdan TT4 genindeki alanları da tanımak üzere tasarlanmıştır (Foley et al., yukarıda geçen ve Zhang et al., yukarıda geçen). Bu özel TALEN'ler Örnek 3, 4 ve 8'de tarif edilen yöntemler kullanılarak oluşturulmuştur. Özel TALEN'lerin işlenmesinde, gözlemlenen bileşim ve konum eğilimleri tasarım ilkeleri veya "kurallar" olarak uyarlanmıştır. Tik olarak kodlama bölgelerinde başında bir 5' T olan ve uzunluk olarak en az 15 bp olan ve yukarıda belirtilen ortalamalarla uyumlu bir nükleotid bileşimine sahip diziler için bir tarama

gerçekleştirilmiştir. Spesifik olarak, sadece %0-63 A, %11-63 C, %0-25 G ve %2-42 T olan alanlar seçilmiştir. Bu tür alanlar ortalama olarak her 7-9 bp'de gerçekleşmiştir. Bunun ardından yukarıda anılan gözlemlenen konum eğilimleriyle uyumlu olan alanlar seçilmiştir. Bu gruptan, işlenen TALEN'lerin bağlanmasının FokI'in dimer oluşturmalarını mümkün kılmak için her bir gende 15-19 bp uzunluğunda olan ve 15-18 bp ile ayırılmış olan iki çift bağlayıcı alan belirlenmiştir. Modüler düzenleme yöntemleri (Örnek 3 ve 4) kısmi uzunluğa sahip yapılar üretmiştir.

16 nükleotid dizisini hedeflemek için toplamda, her biri dokuz veya daha fazla tekrardan oluşan bir dizilime sahip 21 orta ve tam uzunlukta TALEN tasarlanmıştır. Bu TALENlerin aminoasit dizileri ŞEK. 34A-34U arasında sağlanmıştır (SEQ ID NOS:35-55). Bu 21 TALEN, Örnek 2 ve 6'da tarif edilen maya testi kullanılarak DNA'yı bölme özellikleri için test edilmiştir. Aktivite verisi ŞEK. 35'te gösterilmiştir ve Tablo 4A'da özetlenmiştir.

Orta, kısmi uzunluktaki TALENlerin bazıları nükleotid bileşimi ve terminal T açısından kurallara uymayan hedeflere tekabül etmektedir. Tablo 4 her bir TALEN için uzunluğu, bu iki kurala uyumu ve ZFN268'e istinaden aktiviteyi göstermektedir. Bu sonuçlar, RVD'nin uzunluğunu artırmanın genel olarak elde edilen TALEN'in aktivitesini artırdığını göstermektedir. Bu durum, bir DNA hedefinin in vivo olarak tanınabilmesi için minimal bir RVD sayısının olduğunu ortaya koymaktadır. İlâveten, bu kurallara uyumun önemli olduğu görülmektedir. Tespit edilebilir aktivite sergilemeyen altı TALEN'den ikisi hedef bileşim alanını ihlal etmiştir, ikisi NG ile sonuçlanmamıştır ve bir diğeri her iki kurala da uymamıştır (biri her iki kurala da uymuştur). ZFN268'in %25'inin altında aktivite sergileyen sekiz TALEN'den üçü kurallardan birine uymamıştır ve ZFN268'in %25- 50'sinin arasında aktivite sergileyen dört TALEN'den biri NG'de RVD dizisi bitimine sahip olmamıştır. ZFN268'in %50'sinin üzerinde

aktivite sergileyen TALEN'lerin tüm kurallara uyduğu ve aynı uzunluktaki TALEN'ler için kurala uymayanların genel olarak uyanlara göre daha az aktivite sergiledikleri not edilmektedir. Uzunlukla ilgili genel eğilimle uyumlu olarak, kurallara uyanlar için dâhil olmak üzere, karşılık gelen tam uzunluktaki TALEN'ler daha yüksek aktiviteye sahip olmuştur (Tablo 4A ve ŞEK. 35). Aynı hedefte TALEN uzunluk farklılıkları nedeniyle aralayıcı uzunluğundan varyasyon bu gözleme katkıda bulunmuş olabilmektedir, ancak aralayıcı uzunluğunun bazı aralıkları tolere edilebilmektedir (Christian et al., yukarıda geçen).

Veride bazı karmaşıklıklar açıkça görülmüştür. Örneğin, aktivite aynı uzunluktaki uyumlu TALEN'ler arasında farklılık göstermiştir, bazı kısa dizilimler orta derece yüksek aktiviteye sahip olmuştur ve bazı uyumlu uzun dizilimler çok az aktiviteye sahip olmuş veya hiç aktiviteye sahip olmamıştır (Tablo 4B). Bununla beraber, sağlanan sonuçlar 1) genel olarak daha fazla sayıda tekrarın daha yüksek aktiviteyle sonuçlandığı ve 2) bileşim ve konum eğilim kurallarına uyumun aktivite açısından önemli olduğu sonuçlarını desteklemektedir. Bu doğrultuda, aşağıdaki tasarım ilkeleri tasarlanmıştır.

- TAL efektör bağlayıcı alanlar minimum 15 baz uzunluğunda olacak ve 5' ucunun hemen öncesinde bir T yer alacak şekilde 5'ten 3'e oryantasyona sahip olacak şekilde tasarlanmıştır.
- Bir alan birinci (5') konumda bir T'ye ve ikinci konumda bir A'ya sahip olamamaktadır.
- Bir alan bir T (3') ile bitmelidir ve sondan bir önceki konumda bir G'ye sahip 5 olamamaktadır.
- Alanın baz bileşimi belirli bir aralıkta yer almalıdır (ortalama olarak $\pm$ iki standart sapma): A %0-63, C %11-63, G %0-25 ve T %2-42.

Tablo 4A

<i>Maya testlerinde test edilen TALEN'lerin aktivitesi, kurallara uyumu ve uzunluğu</i>
--

Gen	TALEN	Christinn et nl.'daki (vukaridage	RVD' l er	Aktivi te	% GATC	NG i le	RVD dizisi ¹
telomera	124		9		N	Y	HD NN NN NG NG NG NN
gridlock	105		10	+	N	N	NI HD HD HD HD NG HD NG
ADHI	58	ADHI-360-12	12	+T	Y	N	NI NG HD NI NI NN NT NG
ADHI	63	ADHI-408- I2r	12		Y	N	HD HD HD NI NN NT NT NM
ADHI	68	ADHI-928-12	12	+	Y	Y	HD HD NN NN NI NG NN HD
ADHI	73	ADHI-975- I2r	12		N	N	NI NN NI HD NI NT NT HD HD
TT4	89		12		Y	N	NN NN HD NI HD NG NN HD
gridlock	106	gridlock- 2356-13r	13	-I-+	Y	Y	NI HD HD HD HD NG HD NG
ADHI	64		15	+	Y	Y	HD HD HD NI NN NI M NN
ADHI	69		15	++-	Y	Y	ND ND NN NN NI NG NN HD
ADHI	74		15	++	Y	Y	NI NN NI HD NI NT NT HD HD

TT4	9 (1		15		Y	Y	NN NN HD N1 HD NO NN HD
telomera z	121		15	+	Y	Y	HD NG NG NN NG HD HD
telomera z	126		15		N	Y	HD NN NN \G NG NG NN
gridlock	107		16	++++	Y	Y	N1 HD HD HD HD NG HD NG
gridlock	117		16	++	Y	Y	HD HD HD NN NN N1 NI NN
telomera z	131		16	-I-	Y	Y	N1 NG NG HD HD HD HD NI HD
telomera z	136		17	+	N	Y	N1 NN N1 HD NI NN NN M N1
ADHI	60		18	+ 1111	Y	Y	N1 NG HD N1 N1 NN NI HG
TT4	85		18	+	Y	Y	N1 HD NG HD HD NN' HD HD
gridlock	102		18	+	Y	N	NN NN HD NG HD NI HD HD

1 Test edilen hedef diziler ilgili nükleotid dizisinin evrik tekrarlarından oluşmaktadır; HD, NG, N1 ve NN, anılan sıraya göre C, T, A ve G'ye tekabül etmektedir ve 16-18 bp uzunluğunda bir aralayıcı diziyle

Tablo 4B

Tablo 4A tlıın aktivite sırasına göre sıralanmış bir alıntı			
RVD'ler	Aktivite	% GATC	NG ile biter
9	-	n	y
12	-	y	tl
12	-	n	N
12	-	y	N
15	-	y	Y
15	-	n	Y
10	+	n	N
12	+	y	Y
15	+	y	Y
15	+	y	Y
16	+	y	Y
17	+	ll	Y
18	+	y	Y
18	+	y	N
12		y	N
13	++	y	Y
15	++	y	Y
16	++	y	Y
15	+++	y	Y
16	++++	y	Y
18	+++++	y	Y

Örnek 10 - Heterodimerik TALEN çiftleri maya testinde onların doğal oluşumlu hedef dizilerini bölmektedir

- Örnek 2, 6 ve 9'daki veriler, özel TALEN'lerin yeni hedef DNA dizilerini tanımak üzere işlenebileceğini göstermektedir. Özel
- 5 TALEN'ler için maya aktivitesi verisi homodimerik bir alanı tanıyan bireysel TALEN monomerleri kullanılarak toplanmıştır. Diğer bir deyişle, TALEN'in hedef dizisi bir 15-18 bp aralayıcının iki tarafından ters oryantasyonda çoğaltılmıştır. Ancak, endojenöz kromozal dizilerin bölünmesi genel olarak iki
- 10 farklı özel TALEN'in bir araklayıcının iki tarafında iki farklı diziyi tanımasını gerektirmektedir. Örnek 6'da tarif edildiği gibi, bu yetenek, maya testinde karşılık gelen bir kimerik hedef alanı kullanarak birlikte AvrBs3 ve PthXol TALENleri için ortaya konulmuştur. İki farklı özel TALEN'in doğal oluşumlu bir DNA
- 15 dizisini tanıyıp tanıyamadığı ve bölüp bölemediği test edilmiştir. Örnek 2'de tarif edilen maya testi kullanılarak, Arabidopsis ADH 1 geninde iki farklı hedef dizisini bölmek üzere tasarlanmış olan özel TALENler bu hedeflerin aktivitesi için test edilmiştir. Bu hedef alanların ve karşılık gelen TALENlerin
- 20 DNA dizileri ŞEK. 36A'da gösterilmiştir. TALENlerin aminoasit dizileri ŞEK. 34'te sağlanmıştır. Maya testinde elde edilen beta-

galaktosidaz aktivitesi ŞEK. 36B'deki grafikte belirtilmiştir. TALEN'lerin onların doğal oluşumlu hedef dizilerinin üzerindeki aktivitesi kayda değer oranda negatif kontrollerin üzerinde olmuştur; bu, TALEN'lerin endojenöz hedef DNA dizilerini tanımak ve bölmek üzere işlenebileceğini göstermektedir.

Örnek 11 - TALEN'ler Arabidopsis'teki doğal genleri bölmektedir ve kesin olmayan, homolog olmayan uç birleştirme aracılığıyla mutasyonlar tanıtmaktadır Arabidopsis ADHI geninde bir hedef dizisini tanımak üzere tasarlanmış olan aktif TALEN çiftlerinden bir tanesi, onun kromozal DNA'yı bağlayabilme, bölebilde veya mutasyona uğratabilme yeteneğini belirlemek için test edilmiştir. Bu çifti (pTALEN 69 ve 74) içeren bireysel ADHI TALEN'lerin bir biri TALEN'leri konstitütif 35S promotörünün kontrolü altına yerleştiren bitki ekspresyon vektörü pFZ14'ün içine klonlanmıştır (Zhang et al., yukarıda geçen). Elde edilen yapılar bunun ardından elektroporasyon aracılığıyla Arabidopsis protoplastlarının içine tanıtılmıştır. 48 saat sonrasında genomik DNA izole edilmiştir ve Tth1111 ile parçalanmıştır. Bir Tth1111 bölünme alanı iki TALEN tanıma alanının arasındaki aralayıcı dizide konumlu olmaktadır (ŞEK. 37A). Kromozal DNA'nın TALEN aracılığıyla bölünmesinin kesin olmayan, homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) aracılığıyla mutasyonlar tanıtmayı beklenmektedir ve bu, Tth1111 ile bölünmeyi başarısız kılmaktadır. TALEN tanıma alanını kapsayan bir 375 bp fragmanı bunun ardından PCR ile amplifiye edilmiştir. PCR ürünü, TALEN aracılı NEHJ ile modifiye edilmemiş olan geriye kalan genomik DNA'nın çoğunu elimine etmek için tekrar Tth1111 ile parçalanmıştır. Parçalanmış ürünler bunun ardından bir agaroz jelde işlenmiştir. Bölünmemiş bir PCR ürünü gözlemlenmiştir ve bu tür bölünmemiş PCR ürünleri endojenöz hedef dizisinde nükleaz aktivitesinin (bu durumda TALEN aktivitesi) tanısı olmaktadır (Zhang et al., yukarıda geçen).

Kesilmemiş DNA klonlanmıştır ve DNA dizilemeyle analiz edilmiştir. Dokuz adet bağımsız klonun dizilenmesi bunlardan altısının NHEJ tarafından tanıtılan mutasyonlar taşıdığını göstermiştir (ŞEK. 37B). Böylece, TALENter endojenöz kromozal lokusları bölmekte ve DNA çift sarmal kırıklar ve mutasyonlar tanıtmaktadır.

Örnek 12 - Hedefleme kapasitesinin geliştirilmesi

TAL efektör DNA şifresinin temelinde en yaygın dört RVD'nin her biri, ilişki sıklıklarına dayalı olarak dört nükleotid için açık bir şekilde birebir spesifiteye sahip olmaktadır. Bu HD, NG ve NI için daha belirgin, NN için daha az belirgin olmaktadır (ŞEK. 1C). NN en sık olarak G ile ilişkilendirilmektedir, ancak neredeyse aynı sıklıkta A ile, bazen de C veya T ile ilişkilendirilmektedir. Bir 13 RVD dizisinde dört konumda NN içeren rastgele düzenlenmiş TAL efektör için, yapay bir hedefteki ilgili tüm konumlarda G'ye sahip olmak en iyi aktiviteyi sağlamıştır (Boch et al. (2009) Science 326:1509-1512). A aktiviteyi azaltmış ancak yok etmemiştir ve C ve T görülebilir aktiviteyi elimine etmiştir. C, T veya A, 24 RVD efektör PthXol için bir NN olan bağlayıcı alanın hemen birinci konumunda G ile ikame edildiğinde oldukça büyük bir aktivite kaybı gözlemlenmiştir (Romer et al. (2010) New Phytol. 187:1048-1057). Bunun aksine, çok daha kısa olan AvrHah1 (14 RVD) A ile başlayan bir NN ile hizalanmaktadır ve 23 RVD efektör PthXo6, 4-6. Konumda sıra halinde, her biri A ile hizalanan üç adet NN'ye sahip olmaktadır, ancak bunlardan iki tanesi oldukça aktif olmaktadır (bakınız, Schornack et al. (2008) New Phytol. 179:546-556 ve Romer et al., yukarıda geçen). Böylece, G için NN spesifitesi genel olarak zayıf olmaktadır ve içeriğe göre değişiklik gösterebilmektedir.

TAL efektör hedef alanlarının hemen önünde gelen timindeki gözlemlenen değişmezlik çeşitli efektörler için bir

gereksinim olmaktadır [Boch et al., *yukarıda geçen*; Romer et al., *yukarıda geçen* ve Romer et al. (2009) Plant Physiol. 150:1697-1712], TAL efektörlerindeki tekrar bölgesinin hemen önünde gelen, yüksek korunuma olan aminoasit dizisi (ŞEK. 38A) hem aminoasit dizisinde, hem de öngörülen ikinci yapıda tekrarlar kayda değer bir benzerliğe sahip olmaktadır (ŞEK. 38B ve Bodganove et al. (2010) Curr. Opin. Plant Biol. 13:394-401). "0." tekrar olarak adlandırılan bu dizinin bağlayıcı alanın -1 konumunda T için gereksinimin temelini oluşturduğu ve RVD-analog konumundaki kalıntıların (ŞEK. 38B) nükleotidi belirttiği ortaya konmaktadır.

Bu bulgulara dayalı olarak, G için yüksek spesifiteye sahip tekrarların katılması ve -1'de T için gereksinimin gevşetilmesi aracılığıyla tasarlanmış TAL efektör proteinleri için hedefleme kapasitesinin geliştirilebileceği ortaya konmaktadır. Yeni ve nadir RVDTeri NN'nin sergilediğine nispeten G'ye karşı daha sağlam spesifite için test etmek için ve "0." tekrarda RVD-analog kalıntılarını sıradan RVDTerle değiştirmek için deneyler gerçekleştirilmiştir.

10 *G için sağlam spesifite için yeni ve nadir RVD 'ler:* Yukarıda ifşa edilen modüller (bakınız, örneğin Örnek 4) dört nükleotid bazına (A, C, G ve T) bağlanmanın spesifitesi için dört spesifik RVD kullanmıştır (sırasıyla (NI, HD, NN ve NG). Diğer RVDTeri içeren tekrarlar da faydalı olabilmektedir ve

15 NI, HD, NN ve NG'ye nispeten dört baza spesifiteyi ve/veya afiniteyi artırmış olabilmektedir. G'ye karşı spesifiteyi iyileştirmek açısından, yeni ve nadir RVDTeri kodlayan çeşitli tekrarlar oluşturulmuştur. Nadir RVDTer NK, HN ve NA, G ile ilişkilenmiştir, bu da N'nin kalıntıların biri veya

20 diğeri kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır (ŞEK. 1C). Böylece, Tablo 5'te gösterilen RVDTere sahip tekrarları kodlayan geniş bir set türevler oluşturulmuştur. Sol kolon 12. konumda bir polar aminoaside (R, K, D, E, Q, H, S, T veya Y) ve 13. konumda N'ye sahip RVDTeri sıralamaktadır. Sağ

25 kolonlar birinci konumdaki N'nin RVD'nin ikinci konumundaki diğeri 17 aminoasitten (G, L, V, R, K, D, E, Q, H, T, M, C, P, Y, W veya F) herhangi biriyle kombinasyonlarını sıralamaktadır. N'nin yokluğunda daha yüksek spesifite olasılığını göz önünde bulundurmak için, ayrıca 12. konumda

30 bir polar aminoasit (R, K, D, E, Q, H, S, T veya Y) ve 13. konumda (orta kolon) bir boşluk (*) içeren tekrarlar da oluşturulmuştur.

Yeni yapay RVDTer işlevsellik için, TAL efektörlerinin

transkripsiyonal aktivasyon aktivitesi için yukarıda tarif edilen (ör: Örnek 2) *Nicotiana benthamiana*'da örneğin bir GUS veya çift lusiferaz raportör bazlı, *Agrobacterium* aracılı süreksiz ekspresyon deneyi veya *Saccharomyces cerevisiae*'de lacZ raportör bazlı TALEN deneyi gibi bir kantitatif raportör geni bazlı deneyde test edilmiştir. Test edilecek olan RVDTeri içeren tekrar modülleri ölçülebilir ve doyumluk altı seviyesinde aktiviteye sahip bir TAL efektöre veya TALEN'e katılmaktadır ve elde edilen proteinler ilgili konumlardaki dört nükleotidin tamamının entegre permutasyonlarıyla bir grup DNA hedefi üzerinde aktivitelerde farklılıklar için test edilmektedir. Spesifik olarak, in planta ve maya testlerinde minimal olarak aktif olan ve eklenen üç tekrardaki uyumsuzluklara duyarlı olan PthXol varyantı (varyantlarıyla) başlayarak, yeni ve nadir tekrarların her birini (homomerik üçlüler şeklinde) içeren TALEN'ler in vivo olarak karşılık gelen konumların her birinde G içeren hedeflere karşı test edilmiştir. Artan aktivite sergileyen herhangi birisi için deneyler spesifiteyi kesin olarak belirlemek için o konumlardaki diğer nükleotidlere sırası değiştirilmiş hedeflerle tekrarlanmaktadır.

Tablo 5. Test edilecek RVD'ler³

Polar+	Polar	N+hepsi	
RN	R*	NG	NH
KN	K*	NA	NT
DN	D*	NL	NM
EN	E*	NV	NC
QN	Q*	NR	NP
HN	H*	NK	NY
SN	S*	ND	NW
TN	T*	NE	NF
YN	Y*	NQ	

^aN*, NG ve NS nt ilişki sıklıkları
bilinmektedir. Bir * RVD'de 2. konuma
karşılık gelen bir boşluğu temsil
etmektedir (konsensüs tekrar dizisinin 13.

- 7 konumunda T'nin spesifitesini gevşetmek için 0. tekrarda RVD analog konum 15 için sıradan RVD ikameleri: İkincil yapı öngörüler ve 0. tekrarın ve tekrar konsensüs dizilerinin hizalaması, 0. tekrardaki KR* (* bir boşluğu ifade etmektedir) tarafından doldurulan konumların RVD'ye benzer olduğu ve böylece -1'de T'ye belirten kalıntılar olduğunu ortaya koymaktadır. PthXol'in KR için ve ayrıca R* için HD, NG, NI ve NN ikamelerini içeren varyantları yukarıda tarif edilen Tallc "temel" yapısında oluşturulmuştur. Bu varyantların aktiviteleri, -1 konumunda ilgili nükleotidlere (sırasıyla C, T, A ve G) sahip hedefler kullanılarak in planta ve maya testlerinde yaban tipi efektörle karşılaştırılmaktadır. PthXol'in ek varyantları 0. tekrarda 11. konumda K için ikame edilen konsensüs tekrar dizisinin 11. konumundaki kalıntı S'ye sahip olacak şekilde oluşturulmaktadır. Ayrıca, bu ikameye ilaveten 0. tekrarın 15. konumundaki V için konsensüs tekrar dizisinin 16. konumundaki kalıntı K ile bir ikameyi içeren diğer varyantlar oluşturulmaktadır (Tablo 6). TAL efektör aktivitesi için bir yakın TATA kutusu dâhil edilebilmektedir, ilaveten, -1'deki T'nin TATA kutusunun bir parçası olarak görüldüğü AvrBs3'ün aksine, PthXol bağlayıcı alana en yakın kutunun 46 bp aşağı yönlü olması ve -1'deki modifikasyonlar tarafından bozulması nedeniyle PthXol bu deney açısından faydalı olmaktadır.
- 25 Yukarıdaki modifikasyonların G için geliştirilmiş hedeflemeyle veya başında T dışındaki nükleotidlerin yer aldığı dizileri hedefleme yeteneğinde artışla sonuçlanmaması durumunda G spesifitesi için daha kapsamlı bir yapay RVD grubu test

edilmektedir ve 0. tekrar için sıradan RVD'lerin dışında ikameler test edilmektedir.

Doğal 0. tekrar dizisi (-1'de T'yi belirtir)	T'yi belirten ikame	A'yı belirten ikame	C'yi belirten ikame	C'yi belirten ikame
...KIA*KRGGV... (74) t	...KIA*NGGG V... (75)	...KIA*NIGG V... (76)	...KIA*HDGG V... (77)	...KIA*NNGG V... (7S)
...KIA*KRGGV... (79)	...KIASNGGG V... (80)	...KIASNIGG V... (81)	...KIASHDGG V... (82)	...KIASNNGG V... (83)
...K1AKR*GGV... (84)	...K1AKNGGG V... (85)	...K1AKNIGG V... (86)	...K1AKHDGG V... (87)	...K1AKNNGG V... (88)
...K1A*KRGGV... (89)	...K1ASNGGG K... (90)	...K1ASNIGG K... (91)	...KIASHDGG K... (92)	...K1ASNNGG K... (93)

Aday ve ikame edilen RVD'ler koyuyla belirtilmiştir. Diğer ikameler veya modifikasyonların altı çizilmiştir. * konsensüs tekrar dizisine istinaden bir boşluğu ifade etmektedir.

tSF.Q1DNO:

Tablo 6. -1 konumunda A, C, G veya T içeren hedefler için spesifite için oluşturulacak ve test edilecek 0. tekrar yapıları.

Örnek 13 -Yeni öngörülen nkleotid spesifik RVD'ler

Tablo 1A ve 1B'de sıralanan RVD'ler RVD'de ikinci aminoasit kalıntısında gruplandığında (toplamdaki 13. tekrar), o aminoasidin, RVD'nin birinci konumundaki aminoaside bakmaksızın, RVD tarafından belirtilen nükleotid (nükleotidler) ile neredeyse mükemmel bir korelasyona sahip olduğu görülmüştür (Tablo 7). Böylece, bir boşlukla biten RVD'ler (* işareti ile belirtilmiştir) C veya T'yi belirtmektedir; D ile biten RVD'ler C'yi belirtmektedir; G ile biten RVD'ler T'yi belirtmektedir ve N ile biten RVD'ler G veya A'yı veya G'yi belirtmektedir. Ayrıca, RVD'nin 1. konumundaki aminoasitlerin H, I, N, S veya Y olduğu gözlemlenmiştir. Bu gözlemler, RVD spesifitesinin, birinci konumdaki kalıntının H, I, N, S veya Y arasındaki hangisi olduğundan bağımsız olarak, ikinci konumdaki kalıntıyla belirlendiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle, ikinci konumda gözlemlenen kalıntıları birinci konumdaki H, I, S, N veya Y kalıntılarıyla kombine eden çeşitli yeni (henüz gözlemlenmemiş) RVD'ler için spesifiteler öngörülmüştür. Böylece, C veya T'yi veya T'yi belirtmek için 1*, S* ve Y* öngörülmüştür; C'yi belirtmek için YD öngörülmüştür; T'yi belirtmek için SG öngörülmüştür ve G veya A'yı veya G'yi belirtmek için İN veya YN öngörülmüştür. Ayrıca, her ne kadar NK'nin gözlemlenen spesifitesine dayalı olarak ikinci konumda sadece bir K mevcut olmuş olsa da, HK, IK, SK ve YK'nin G'yi belirttiği öngörülmüştür.

Bu yeni RVD'ler Örnek 2 ve 11'de tarif edilen kantitatif TAL efektör ve TALEN aktivite deneylerinde işlev ve spesifite için test edilmektedir ve mevcut RVD'lerle karşılaştırılmaktadır.

Tablo 7¹

ikinci kalıntılarına göre gruplanan ve sınırlandırılan R		
1. kalıntı	2. kalıntı	Nükleotid
N	*	C veya T
H	*	T
H	A	C
N	A	G
H	D	C
N	D	C

H	G	T
l	G	T
N	G	T
Y	G	T
N	I	A
H	I	C
N	K	G
H	N	G
S	N	G veya A
N	N	G veya A ¹
N	S	A veya C
Bir * bir boşluğu ifade etmektedir. Benzer spesifiteye sahip RVD grupları kalın çizgilerle kutu içine alınmıştır.		

Örnek 14 - Özel TALEN'ler hayvan hücrelerinde endojenöz hedefleri bölmektedir ve kesin olmayan, homolog olmayan uç birleştirme aracılığıyla mutasyonlar tanıtılmaktadır TALEN'lerin hayvan hücrelerinde hedefli mutajenez için kullanılıp kullanılamayacağını test etmek için ilk olarak TAL efektörleri AvrBs3, PthXol ve Tal1c'nin insan embriyonik böbrek (HEK) 293T hücrelerinde ekspresyonu test edilmiştir. Stop kodonu, AvrBs3, PthXol ve Tal1c kodlayan genlerden çıkarılmıştır ve genler, protein immün-tespiti için V5 epitopunu kodlayan vektör pcDNA3.2/V5-DEST'in TAL efektör genini temel insan sitomegalovirüsü (CMV) promotörünün kontrolü altına yerleştirdiği şekilde memeli ekspresyon vektörü pcDNA3.2/V5-DEST'e (Invitrogen, Carlsbad, CA) aşağı yönlü diziyle çerçeve içerisinde alt klonlanmıştır. HEK 293T hücreleri Lipofectamine 2000 (In-vitrogen) kullanarak, elde edilen plazmitlerle bireysel olarak transfecte edilmiştir ve 24 saat sonrasında proteinlerin tamamı transfecte edilmiş her hücre grubundan izole edilmektedir ve poliakrilamid jel elektroforezi, batı lekeleme ve bir fare anti-V5 antikoru kullanılarak immün-etiketlemeye tabi tutulmaktadır. Etiketlenen proteinler SuperSignal West Pico Chemiluminescent kiti (ThermoScientific, Inc.) kullanılarak bir keçi, anti-fare antikor yaban turpu peroksidaz konjuge ile tespit edilmiştir. Eşdeğer yükleme aktinin immün- etiketlenmesi ve tespitiyle teyit edilmiştir. Her bir TAL efektör proteini belirgin bir bozulma söz konusu olmadan algılanabilir bir şekilde ifade eksprese edilmiştir (ŞEK. 39).

Bunun ardından, bir çift TALEN, endojenöz insan HPRT genindeki bir diziyi hedeflemek için Örnek 9'da tarif edilen şekilde tasarlanmıştır ve HPRT-3254-17 ve HPRT-3286-20r olarak adlandırılmıştır (ŞEK. 40A ve ŞEK. 40B), HPRT-3254-17'yi kodlayan plazmit pTALEN141 ve HPRT-3286-20r'yi kodlayan plazmit pTALEN142, Golden Gate klonlama yöntemi ve Örnek 8'de tarif edilen reaktifler kullanılarak oluşturulmuştur. TALEN genleri

bunun ardından memeli ekspresyon vektörü pCDNA3.1(-) (Invitrogen, İne.) içine alt klonlanmıştır, bu onları konstitütif CMV promotörünün kontrolü altına yerleştirmiştir ve plazmitler pTALEN141M ve pTALEN142M elde edilmiştir. HEK 293T hücreleri bunun ardından hem pTALEN141M ve pTALEN142M ile birlikte, hem de negatif kontrol olarak pCDNA3.1(-) ile ayrı olarak transfekte edilmiştir. 72 saat sonunda genomik DNA izole edilmiştir ve restriksiyon endonükleazı BpuIOI ile parçalanmıştır. HPRT'de HPRT- 3254-17 ve HPRT-3286-20r bağlayıcı alanları ayıran bir aralayıcının içinde bir BpuIOI alanı mevcut olmaktadır (ŞEK. 41A). BpuIOI parçalanmasının ardından TALEN hedefli alanı boylayan bir 244 bp fragmanını hem TALEN ile işlenen, hem de kontrol numunelerinden amplifiye etmek için PCR kullanılmıştır. Beklenen fragman her iki numuneden amplifiye edilmiştir; bu, genomik DNA'nın BpuIOI parçalanmasının eksik olduğunu belirtmektedir. Ancak, PCR ürünlerinin BpuIOI ile müteakip parçalanması kontrol numunesinden amplifiye edilen ürünün tam olarak bölünmesiyle, ama ürünün TALEN ile işlenen numuneden eksik olarak bölünmesiyle sonuçlanmıştır (ŞEK. 41B). TALEN ile işlenen numunede bölünmeye dirençli PCR ürününün varlığı, endojenöz BpuIOI alanının, HPRT'de amaçlanan hedefte bir TALEN aracılı çift sarmal kırığının homolog olmayan uç birleştirmesi aracılığıyla kusurlu onarım sonucu in vivo olarak mutasyona uğradığının kanıtı olmaktadır. Bu doğrultuda, TALEN'ler memeli hücrelerin hedefli mutajenezi için kullanılabilir.

DİZİ LİSTESİ

<110> Minnesota Üniversitesi Iowa Eyalet Üniversitesi
Araştırma Vakfı A.Ş.

<120> TAL EFEKTÖRÜ ARACILI DNA MODİFİKASYONU

5 <130> 09531/0305W01

<140> PCT/US2010/059932 <141> 2010-12-10

<150> 61/366,685 <151> 2010-07-22

<150> 61/352,108 <151> 2010-06-07

<150> 61/285,324 <151> 2009-12-10 <160> 93

10 <170> Windows versiyonu 4.0 için FastSEQ

<210> 1 <211> 34 <212> PRT

<213> Yapay Dizi <220>

<223> cinse özgü dizi <400> 1

Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly
Gly Lys 15 10 15

Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
Gin Ala 20 25 30

5 His Gly

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

10 <220>

<223> hedef dizi

<400> 2

agaagaagag acccata 17

<210> 3

15 <211> 18

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> hedef dizi

20 <400> 3

atataaacct aaccatcc 18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

5 <213> Yapay Dizi

<220>

<223> hedef dizi

<400> 4

atataaacct gacccttt 18

10 <210> 5

<211> 14

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

15 <223> hedef dizi

<400> 5

atataaacct ctct 14

<210> 6

<211> 15

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> hedef dizi

<400> 6

atataaacct aacca 15

<210> 7

<211> 14

5 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> hedef dizi

<400> 7

10 ataaacctaa ccat 14

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

15 <220>

<223> hedef dizi

<400> 8

gcattctcccc ctactgtaca ccac 24

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

5 <223> hedef dizi

<400> 9

ataaaaggcc ctcaccaacc cat 23

<210> 10

<211> 22

10 <212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> hedef dizi

<400> 10

15 ataatcccca aatcccctcc tc 22

<210> 11

<211> 16

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> hedef dizi

<400> 11

ccccctcgct tccctt 16

<210> 12

<211> 1164

<212> PRT

<213> Xanthomonas euvesicatoria

5 <400> 12

```
Met Asp Pro lie Arg Ser Arg Thr Pro Ser Pro Ala Arg Glu
Leu Leu 15              10              15
Pro Gly Pro Gin Pro Asp Gly Val Gin Pro Thr Ala Asp Arg
      Gly Val 20        25              30
10 Ser Pro Pro Ala Gly Gly Pro Leu Asp Gly Leu Pro Ala Arg
      Arg Thr 35        40              45
Met Ser Arg Thr Arg Leu Pro Ser Pro Pro Ala Pro Ser Pro
Ala Phe
      50              55              60
15 Ser AlaGlySer PheSer AspLeuLeuArgGin PheAspProSerLeu
65              70              75              80
Phe AsnThrSer LeuPheAspSer LeuProPro PheGlyAlaHisHis
      85              90              95
Thr Glu Ala Ala Thr Gly Glu Trp Asp Glu Val Gin Ser Gly
20 Leu Arg
      100              105              110
Ala Ala Asp Ala Pro Pro Pro Thr Met Arg Val Ala Val Thr
Ala Ala
      115              120              125
25 Arg Pro Pro Arg Ala Lys Pro Ala Pro Arg Arg Arg Ala Ala
Gin Pro
      130              135              140
Ser AspAlaSer ProAlaAlaGinValAspLeu ArgThrLeuGlyTyr
145              150              155              160
30 Ser GinGinGinGinGluLyslieLysProLys ValArgSerThrVal
```

		165		170		175	
		Ala	Gln	His	His	Glu	Ala
						Leu	Val
						Gly	His
						Gly	Phe
						Thr	His
						Ala	His
		180		185		190	
5		lie	Val	Ala	Leu	Ser	Gln
						His	Pro
						Ala	Ala
						Leu	Gly
						Thr	Val
						Ala	Val
		195		200		205	
		Lys	Tyr	Gln	Asp	Met	lie
						Ala	Ala
						Leu	Pro
						Glu	Ala
						Thr	His
						Glu	Ala
10		210		215		220	
		lie	Val	Gly	Val	Gly	Lys
						Gln	Trp
						Ser	Gly
						Ala	Arg
						Ala	Leu
						Glu	Ala

225	230	235	240
Leu Leu Thr Val Ala Gly Glu Leu Arg Gly Pro Pro Leu Gin			
Leu Asp			
245	250	255	
Thr Gly Gin Leu Leu Lys lie Ala Lys Arg Gly Gly Val Thr			
Ala Val			
260	265	270	
Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu Thr Gly Ala Pro			
Leu Asn			
275	280	285	
Leu Thr Pro Glu Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly			
Gly Lys			
290	295	300	
Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys			
GinAla			
305	310	315	320
His Gly LeuThrPro Gin GinValVal Ala lieAlaSer Asn			
GlyGly			
325	330	335	
Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val			
Leu Cys			
340	345	350	
Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Gin Gin Val Val Ala lie Ala			
Ser Asn			
355	360	365	
Ser Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu			
Pro Val			
370	375	380	
Leu Cys GinAlaHis Gly LeuThrPro Glu GinValVal Ala			
lieAla			
385	390	395	400
Ser Asn GlyGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg			
LeuLeu			
405	410	415	
Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gin Val			

Val Ala
 420 425 430
 lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Ala
 435 440 445
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 Gin Val
 450 455 460
 Val Ala lieAlaSer Asn lieGlyGly Lys GinAlaLeu Glu
 ThrVal
 465 470 475 480
 Gin Ala LeuLeuPro Val LeuCysGin Ala HisGlyLeu Thr
 ProGlu
 485 490 495
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala
 Leu Glu
 500 505 510
 Thr Val Gin Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly
 Leu Thr
 515 520 525
 Pro Glu Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 Gin Ala
 530 535 540
 Leu Glu ThrValGin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Ala
 HisGly
 545 550 555 560
 Leu Thr ProGluGin Val ValAlalie Ala SerHisAsp Gly
 GlyLys
 565 570 575
 Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 Gin Ala
 580 585 590
 His Gly Leu Thr Pro Gin Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn
 Gly Gly
 595 600 605

Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val
Leu	Cys												
610				615				620					
Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	lie	Ala
	Ser	Asn											
625				630				635			640		
Ser	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Ala	Leu	Leu
	Pro	Val											
			645				650				655		
Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala
lie	Ala												
		660				665				670			
Ser	Asn	Ser	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg
Leu	Leu												
		675				680				685			
Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val
Val	Ala												
	690			695				700					
lie	Ala	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val
		Gln	Arg										
705				710				715			720		
Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu
		Gln	Val										
				725				730			735		

Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
Thr Val 740 745 750
Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr
Pro Glu 755 760 765
Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala
Leu Glu
770 775 780
Thr ValGinArgLeuLeu Pro ValLeuCys Gin AlaHisGly Leu
Thr
785 790 795 800
Pro GinGinValValAla lie AlaSerAsn Gly GlyGlyArg Pro
Ala
805 810 815
Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala
His Gly
820 825 830
Leu Thr Pro Glu Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly
Gly Lys
835 840 845
Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
Gin Ala
850 855 860
His GlyLeuThrProGin Gin ValValAla lie AlaSerAsn Gly
Gly
865 870 875 880
Gly ArgProAlaLeuGlu Ser lieValAla Gin LeuSerArg Pro
Asp
885 890 895
Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu
Ala Cys
900 905 910
Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu
Pro His
915 920 925
Ala Pro Ala Leu lie Lys Arg Thr Asn Arg Arg lie Pro Glu

Arg Thr
 930 935 940
 Ser HisArgValAlaAsp His AlaGinVal Val ArgValLeu Gly
 Phe
 945 950 955 960
 Phe GinCysHisSerHis Pro AlaGinAla Phe AspAspAla Met
 Thr
 965 970 975
 Gin Phe Gly Met Ser Arg His Gly Leu Leu Gin Leu Phe Arg
 Arg Val
 980 985 990
 Gly Val Thr Glu Leu Glu Ala Arg Ser Gly Thr Leu Pro Pro
 Ala Ser
 995 1000 1005
 Gin Arg Trp Asp Arg lie Leu Gin Ala Ser Gly Met Lys Arg
 Ala Lys
 1010 1015 1020
 Pro Ser Pro Thr Ser Thr Gin Thr Pro Asp Gin Ala Ser Leu
 His Ala 1025 1030 1035 1040
 Phe Ala Asp Ser Leu Glu Arg Asp Leu Asp Ala Pro Ser Pro
 Met His
 1045 1050 1055
 Glu Gly Asp Gin Thr Arg Ala Ser Ser Arg Lys Arg Ser Arg
 Ser Asp
 1060 1065 1070
 Arg Ala Val Thr Gly Pro Ser Ala Gin Gin Ser Phe Glu Val
 Arg Val
 1075 1080 1085
 Pro Glu Gin Arg Asp Ala Leu His Leu Pro Leu Ser Trp Arg
 Val Lys
 1090 1095 1100
 Arg Pro Arg Thr Ser lie Gly Gly Gly Leu Pro Asp Pro Gly
 Thr Pro 1105 1110 1115 1120
 Thr Ala Ala Asp Leu Ala Ala Ser Ser Thr Val Met Arg Glu
 Gin Asp

	1125	1130	1135
Glu Asp Pro Phe Ala Gly Ala Ala Asp Asp Phe Pro Ala Phe			
Asn Glu			

	1140	1145	1150
Glu Glu Leu Ala Trp Leu Met Glu Leu Leu Pro Gin			
1155	1160		

<210> 13

<211> 4366

<212> DNA

<213> Xanthomonas euvesicatoria

<400> 13

gaattcaagg	tgtcaaaaag	cgataggcgg	aattatagat	gtacttgtat
gaacttatca			60	

acgccagttt agtgaacggg ttcgacaaag cgaaaccaac acccaggcgc
 gaaagccttg 120 cgccgcaatg ctttccggca atgtgacca gggcattgac
 cgaaacggcg taggaatttc 180 ggaacacgac ggtaggggaa tgctctaccg
 cccggctacg caaaagcact ctgcctcgcc 240 agacgcgccca ctgcgtggaa
 ttggccgtta tgtccgctgg cggcctcgcc gccgtagtgc 300 ttgcagcgca
 gccttgaatg atcgaacatc aaacatcact gtttgatagg tcgatcatga 360
 catcgcccat ttcgaggggc ggcaggggatt cgtgtaaaaa acagccaaaa
 gtgagctaac 420 tcgctgtcag cacagaaatt ttccacaacc ttctgccgat
 cctccatgcg ggtccgtgat 480 cgccttcatg tetgcgcctc accctggctg
 tcgaggggtt ccaggatcac ccgaagtgtg 540 gtactgccat ggcgcctcgg
 aagctatgta ggaaccacag accgctagtc tggaggcgac 600 catgtaaaga
 ggtatgcctg atggatccca ttcgttcgcg cacaccaagt cctgcccgcg 660
 agcttctgcc cggaccccaa cccgatgggg ttcagccgac tgcagatcgt
 ggggtgtctc 720 cgctgcgcg cggcccccctg gatggcttgc ccgctcggcg
 gacgatgtcc cggacccggc 780 tgccatctcc cctgcccc tcacctgcgt
 tctcggcggg cagcttcagt gacctgttac 840 gtcagttcga tccgtcactt
 ttttaatacat cgctttttga ttcattgcct ccttcggcg 900 ctaccatac
 agaggctgcc acaggcgagt gggatgaggt gcaatcgggt ctgcgggcag 960
 ccgacgcccc cccaccacc atgcgcgtgg ctgtcactgc cgcgcggccg
 ccgcgcgcca 1020 agccggcgcc ggcacgacgt gctgcgcaac
 cctccgacgc ttcgcgggcc ggcaggtgg 1080 atctacgcac
 gctcggctac agccagcagc aacaggagaa gatcaaaccg aaggttcgtt
 1140 cgacagtggc gcagcaccac gaggcactgg tcggccatgg
 gtttacacac ggcacatcg 1200 ttgcgctcag ccaacaccgc
 gcagcgttag ggaccgtcgc tgtcaagtat caggacatga 1260
 tcgcagcgtt gccagaggcg acacacgaag cgatcgttgg cgtcggcaaa
 cagtggctcg 1320 ggcacgcgc tetggaggcc ttgctcacgg
 tggcgggaga gttgagaggt ccaccgttac 1380 agttggacac
 aggccaactt ctcaagattg caaaacgtgg cggcgtgacc gcagtggagg
 1440 cagtgcacgc atggcgcaat gcaactgacg gtgccccct
 gaacctgacc ccggagcagg 1500 tgggtggccat cgccagccac
 gatggcggca agcaggcgct ggagacggtg cagcggctgt 1560
 tgccggtgct gtgccaggcc catggcctga cccgcagca ggtggtggcc
 atcgccagca 1620 atggcggtgg caagcaggcg ctggagacgg
 tgcagcggct gttgccggtg ctgtgccagg 1680 cccatggcct

gaccccgag caggtggtgg ccatcgccag caatagcggg ggcaagcagg
1740 cgctggagac ggtgcagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca
ggcccatggc ctgaccccg 1800 agcaggtggt ggccatcgcc
agcaatggcg gtggcaagca ggcgctggag acggtgcagc 1860
ggctgttgcc ggtgctgtgc caggcccatg gctgacccc ggagcaggtg
gtggccatcg 1920 ccagcaatat tggtaggaag caggcgctgg
agacggtgca ggcgctgttg ccggtgctgt 1980 gccaggccca
tggcctgacc ccgagcagg tggtaggcat cgccagcaat attggtggca
2040 agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt tgccggtgct
gtgccaggcc catggcctga 2100 ccccgagca ggtggtggcc
atcgccagca atattggtgg caagcaggcg ctggagacgg 2160
tgcaggcgct gttgccggtg ctgtgccagg cccatggcct gaccccgag
caggtggtgg 2220 ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg
cgctggagac ggtgcagcgg ctgttgccgg 2280 tgctgtgcca
ggcccatggc ctgaccccg agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg
2340 gcggcaagca ggcgctggag acggtgcagc ggctgttgcc
ggtgctgtgc caggcccatg 2400 gctgacccc gcagcaggtg
gtggccatcg ccagcaatgg cggtggcaag caggcgctgg 2460
agacggtgca gcggtgttg ccggtgctgt gccaggccca tggcctgacc
ccgagcagg 2520 tggtaggcat cgccagcaat agcggtggca
agcaggcgct ggagacggtg caggcgctgt 2580 tgccggtgct
gtgccaggcc catggcctga ccccgagca ggtggtggcc atcgccagca
2640 atagcggtag caagcaggcg ctggagacgg tgcagcggct
gttgccggtg ctgtgccagg 2700 cccatggcct gaccccgag
caggtggtgg ccatcgccag ccacgatggc ggcaagcagg 2760
cgctggagac ggtgcagcgg ctgttgccgg tgctgtgcca ggcccatggc
ctgaccccg 2820 agcaggtggt ggccatcgcc agccacgatg
gcggcaagca ggcgctggag acggtgcagc 2880 ggctgttgcc
ggtgctgtgc caggcccatg gctgacccc ggagcaggtg gtggccatcg
2940 ccagccacga tggcggaag caggcgctgg agacggtgca
gcggtgttg ccggtgctgt 3000 gccaggccca tggcctgacc
ccgagcagg tggtaggcat cgccagcaat ggccggcgca 3060
ggccggcgct ggagacggtg cagcggtgtg tgccggtgct gtgccaggcc
catggcctga 3120 ccccgagca ggtggtggcc atcgccagcc
acgatggcgg caagcaggcg ctggagacgg 3180 tgcagcggct

```

gttgccggtg ctgtgccagg cccatggcct gaccccgag caggtggtgg
3240 ccatcgccag caatggcggc ggcaggccgg cgctggagag
cattgttgcc cagttatctc 3300 gccctgatcc ggcgttggcc
gcgttgacca acgaccacct cgtcgccttg gcctgcctcg 3360
gcggacgtcc tgcgctggat gcagtgaaaa agggattgcc gcacgcgccg
gccttgatca 3420 aaagaaccaa tcgccgtatt cccgaacgca
catcccatcg cgttgccgac cacgcgcaag 3480 tggttcgcgt
gctggggttt ttccagtgcc actcccaccc agcgcaagca tttgatgacg
3540 ccatgacgca gttcgggatg agcaggcacg ggttgttaca
gctcttttcgc agagtgggcg 3600 tcaccgaact cgaagcccgc
agtggaacgc tccccccagc ctgcgcagct tgggaccgta 3660
tcctccaggc atcagggatg aaaagggcca aaccgtcccc tacttcaact
caaacgccgg 3720 atcaggcgtc tttgcatgca ttcgccgatt
cgctggagcg tgaccttgat ggcctagcc 3780 caatgcacga
gggagatcag acgcgggcaa gcagccgtaa acggtcccga tcggatcgtg
3840

```

ctgtcaccgg tccctccgca cagcaatcgt tcgaggtgcg cgttcccga
 cagcgcgatg 3900 cgctgcattt gcccctcagt tggagggtaa aacgcccgcg
 taccagtatc gggggcggcc 3960 tcccggatcc tggtagccc acggtgcgcg
 acctggcagc gtccagcacc gtgatgcggg 4020 aacaagatga ggaccccttc
 gcaggggcag cggatgattt cccggcattc aacgaagagg 4080 agctcgcatg
 gttgatggag ctattgcctc agtgaggctc agtcggtgac tacctgagcg 4140
 tcggcaggga ttggtgtaag taacctttac tgacagcgag ttagccact
 tttggctggt 4200 ttttacacaa atccctgcct cccctctggt tgcaccacac
 ccgtacacca agcgcgggcg 4260 cgaagcaggc accgagtggg tccgctgcgg
 tgttgcgttc cctaaccagg gcggtggcta 4320 tacgctcaag ctgcgcaccg
 tcccggtggc gatcgacgac gaaatg 4366

<210> 14

<211> 56

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> hedef dizi

<400> 14

tatataaacc taaccatcct cacaacttca agttatcgga tggtagggt tatata 56

<210> 15

<211> 56

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> hedef dizi

<400> 15

tatataaacc taaccatccg ataacttgaa gttgtgagga tggtaggtt tatata
56

<210> 16

<211> 1373

<212> PRT

<213> Xanthomonas euvesicatoria

<400> 16

Met Asp Pro lie Arg Ser Arg Thr Pro Ser Pro Ala Arg
 Glu Leu Leu 15 10 15
 Pro Gly Pro Gin Pro Asp Arg Val Gin Pro Thr Ala Asp
 Arg Gly Gly 20 25 30
 Ala Pro Pro Ala Gly Gly Pro Leu Asp Gly Leu Pro Ala Arg
 Arg Thr 35 40 45
 Met Ser Arg Thr Arg Leu Pro Ser Pro Pro Ala Pro Ser Pro
 Ala Phe
 50 55 60
 Ser AlaGlySerPheSerAspLeuLeuArgGinPheAspProSerLeu
 65 70 75 80
 Leu AspThrSerLeuLeuAspSerMetProAlaValGlyThrProHis
 85 90 95
 Thr Ala Ala Ala Pro Ala Glu Cys Asp Glu Val Gin Ser Gly
 Leu Arg
 100 105 110
 Ala Ala Asp Asp Pro Pro Pro Thr Val Arg Val Ala Val Thr
 Ala Ala
 115 120 125
 Arg Pro Pro Arg Ala Lys Pro Ala Pro Arg Arg Arg Ala Ala
 Gin Pro
 130 135 140
 Ser AspAlaSerProAlaAlaGinValAspLeuArgThrLeuGlyTyr
 145 150 155 160
 Ser GinGinGinGinGluLyslieLysProLysValGlySerThrVal
 165 170 175
 Ala Gin His His Glu Ala Leu Val Gly His Gly Phe Thr His
 Ala His
 180 185 190
 lie Val Ala Leu Ser Arg His Pro Ala Ala Leu Gly Thr Val
 Ala Val

195	200	205		
Lys Tyr Gin Asp Met	lie Ala Ala Leu Pro	Glu Ala Thr His		
Glu Asp				
210	215	220		
lie Val GlyValGly Lys	GinTrpSer Gly	AlaArgAla Leu		
GluAla				
225	230	235	240	
Leu Leu ThrValAla Gly	GluLeuArg Gly	ProProLeu Gin		
LeuAsp				
245	250	255		
Thr Gly Gin Leu Val Lys	lie Ala Lys Arg Gly Gly Val Thr			
Ala Val				
260	265	270		
Glu Ala Val His Ala Ser Arg Asn Ala Leu Thr Gly Ala Pro				
Leu Asn				
275	280	285		
Leu Thr Pro Ala Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Asn Gly				
Gly Lys				
290	295	300		
Gin Ala LeuGluThr Val	GinArgLeu Leu	ProValLeu Cys		
GinAla				
305	310	315	320	
His Gly LeuThrPro Ala	GinValVal Ala	lieAlaSer His		
AspGly				
325	330	335		
Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Met Gin Arg Leu Leu Pro Val				
Leu Cys				
340	345	350		
Gin Ala His Gly Leu Pro Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala				
Ser Asn				
355	360	365		
lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu				
Pro Val				
370	375	380		
Leu Cys GinAlaHis Gly	LeuThrPro Asp	GinValVal Ala		

lieAla
 385 390 395 400
 Ser His GlyGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
 LeuLeu
 405 410 415
 Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 420 425 430
 lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 435 440 445
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 450 455 460
 Val Ala lieAlaSer Asn GlyGlyGly Lys GinAlaLeu Glu
 ThrVal
 465 470 475 480
 Gin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Ala HisGlyLeu Thr
 ProAsp
 485 490 495
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu
 Glu Thr
 500 505 510
 Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu
 Thr Pro
 515 520 525
 Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin
 Ala Leu
 530 535 540
 Glu Thr ValGinArg Leu LeuProVal Leu CysGinThr His
 GlyLeu
 545 550 555 560
 Thr Pro AlaGinVal Val AlalieAla Ser HisAspGly Gly
 LysGin
 565 570 575

Ala Leu Glu Thr Val Gin Gin Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin
 Ala His
 580 585 590
 Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie
 Gly Gly
 595 600 605
 Lys Gin Ala Leu Ala Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu
 Cys Gin
 610 615 620
 Ala His GlyLeuThr Pro AspGinVal Val AlalieleAla Ser
 AsnGly
 625 630 635 640
 Gly Gly LysGinAla Leu GluThrVal Gin ArgLeuLeu Pro
 ValLeu
 645 650 655
 Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie
 Ala Ser
 660 665 670
 Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu
 Leu Pro
 675 680 685
 Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Gin Val Gin Val Val
 Ala lie
 690 695 700

Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin
 Arg Leu

705 710 715 720
 Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Ala Gin
 Val Val

725 730 735
 Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr
 Val Gin

740 745 750
 Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro
 Asp Gin

755 760 765
 Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu
 Glu Thr

770 775 780
 Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu
 Thr Gin

785 790 795 800
 Glu Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gin
 Ala Leu

805 810 815
 Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His
 Gly Leu

820 825 830
 Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly
 Lys Gin

835 840 845
 Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin
 Ala His

850 855 860
 Gly Leu Thr Pro Ala Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie
 Gly Gly

865 870 875 880
 Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu

CysGin
 885 890 895
 Asp His Gly Leu Thr Leu Ala Gin Val Val Ala lie Ala Ser
 Asn lie
 900 905 910
 Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro
 Val Leu
 915 920 925
 Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Gin Asp Gin Val Val Ala lie
 Ala Ser
 930 935 940
 Asn lie GlyGlyLys Gin AlaLeuGlu Thr ValGinArg Leu
 LeuPro
 945 950 955 960
 Val Leu CysGinAsp His GlyLeuThr Pro AspGinVal Val
 Alalie
 965 970 975
 Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin
 Arg Leu
 980 985 990
 Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Leu Asp Gin
 Val Val
 995 1000 1005
 Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 1010 1015 1020
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val 1025 1030 1035 1040
 Val Ala lie Ala Ser Asn Ser Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 1045 1050 1055
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asn
 1060 1065 1070
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu

Glu Ser
 1075 1080 1085
 lie Val Ala Gin Leu Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala
 Leu Thr
 1090 1095 1100
 Asn Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro
 Ala Met 1105 1110 1115 1120
 Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Pro His Ala Pro Glu Leu lie
 Arg Arg
 1125 1130 1135
 Val Asn Arg Arg lie Gly Glu Arg Thr Ser His Arg Val Ala
 Asp Tyr
 1140 1145 1150
 Ala Gin Val Val Arg Val Leu Glu Phe Phe Gin Cys His Ser
 His Pro
 1155 1160 1165
 Ala Tyr Ala Phe Asp Glu Ala Met Thr Gin Phe Gly Met Ser
 Arg Asn
 1170 1175 1180
 Gly Leu Val Gin Leu Phe Arg Arg Val Gly Val Thr Glu Leu
 Glu Ala 1185 1190 1195 1200
 Arg Gly Gly Thr Leu Pro Pro Ala Ser Gin Arg Trp Asp Arg
 lie Leu

1205	1210	1215
Gin Ala Ser Gly Met Lys Arg	Ala Lys Pro Ser	Pro Thr Ser
Ala Gin		
1220	1225	1230
Thr Pro Asp Gin Ala Ser Leu	His Ala Phe	Ala Asp Ser Leu
Glu Arg		
1235	1240	1245
Asp Leu Asp Ala Pro Ser	Pro Met His	Glu Gly Asp Gin Thr
Gly Ala		
1250	1255	1260
Ser Ser Arg Lys Arg	Ser Arg Ser	Asp Arg Ala Val Thr
Gly Pro Ser		
1265	1270	1275
Ala Gin His Ser Phe	Glu Val Arg	Val Pro Glu Gin Arg
Asp Ala Leu		
1285	1290	1295
His Leu Pro Leu Ser Trp	Arg Val Lys Arg	Pro Arg Thr Arg
lie Gly		
1300	1305	1310
Gly Gly Leu Pro Asp Pro	Gly Thr Pro lie	Ala Ala Asp Leu
Ala Ala		
1315	1320	1325
Ser Ser Thr Val Met Trp	Glu Gin Asp Ala	Ala Pro Phe Ala
Gly Ala		
1330	1335	1340
Ala Asp Asp Phe Pro Ala	Phe Asn Glu Glu	Glu Leu Ala Trp
Leu Met 1345	1350	1355
Glu Leu Leu Pro Gin Ser	Gly Ser Val Gly	Gly Thr lie
1365	1370	

<210> 17

<211> 102

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<220>

<221> muhtelif özellik

<222> 34, 35, 36

<223> n = CAT or CAC or AAC or AAT

<220>

<221> muhtelif özellik

<222> 37, 38, 39

<223> n = GAC or GAT or GGA or GGC or GGG or GGT or TCA or TCC
or TCG or TCT or AGC or AGT or ATA or ATC or ATT <400> 17

ctgaccccggt cacaggtggt ggccatcgcc agennnnnnng gcggcaagca
ggcgctggag 60 acggtgcagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggaccatg
gc 102

<210> 18

<211> 34

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<220>

<221> VARYANT

<222> 12, 13

<223> Xaa = His Asp or Asn Gly or Asn Ser or Asn Ile

<400> 18

Leu Thr Pro Ala Gin Val Val Ala lie Ala Ser Xaa Xaa Gly
Gly Lys 15 10 15

Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
Gin Asp 20 25 30

His Gly

<210> 19

<211> 63

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<220>

<221> muhtelif özellik

<222> 34, 35, 36

<223> n = CAT or CAC or AAC or AAT

<220>

<221> muhtelif özellik

<222> 37, 38, 39

<223> n = GAC or GAT or GGA or GGC or GGG or GGT or TCA or TCC
or TCG or TCT or AGC or AGT or ATA or ATC or ATT <400> 19

ctgacccccgg cacaggtggt ggccatcgcc agcnnnnnng gcggcaagca
ggcgctcgag 60 age 63

<210> 20

<211> 21

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<220>

<221> VARYANT

<222> 12, 13

<223> Xaa = His Asp or Asn Gly or Asn Ser or Asn Ile

<400> 20

Leu Thr Pro Ala Gin Val Val Ala lie Ala Ser Xaa Xaa Gly
Gly Lys 15 10 15

Gin Ala Leu Glu Ser 20

<210> 21

<211> 12

<212> DNA

<213> *Xanthomonas oryzae*

<400> 21

gcgctggaga gc 12

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Xanthomonas oryzae

<400> 22

Ala Leu Glu

Ser 1

<210> 23

<211> 12

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 23

gcgctcgagt cc 12

<210> 24

<211> 102

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 24

```
tcgagacggt gcagcggctg ttgccggtgc tgtgccagga ccatggcctg
accccgacc 60 aagtgggtggc catcgccagc aacattggcg gcaagcaagc
gc 102
```

<210> 25

<211> 102

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 25

```
tcgagcgctt gcttgccgcc aatgttgctg gcgatggcca ccacttggtc
cggggtcagg 60 ccatggtcct ggcacagcac cggcaacagc cgctgcaccg
tc 102
```

<210> 26

<211> 35

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 26

Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His
Gly Leu 15 10 15

Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly
Lys Gin 20 25 30

Ala Leu
G1
u
35

<210> 27

<211> 102

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 27

tcgaaaacggt gcagcggctg ttgccggtgc tgtgccagga ccatggcctg
accccgacc 60 aagtgggtggc tatcgccagc aacattggcg gcaagcaagc
gc 102

<210> 28

<211> 102

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 28

```
tcgagcgctt gcttgccgcc aatggtgctg gcgatagcca ccacttggtc
cggggtcagg 60 ccatggtcct ggcacagcac cggcaacagc cgctgcaccg
tt                                                    102
```

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> hedef dizi

<400> 29

```
atcaagattc tcttcact 18
```

<210> 30

<211> 15

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> hedef dizi

<400> 30

cccagaagta aacat 15

<210> 31

<211> 598

<212> PRT

<213> *Xanthomonas oryzae*

<400> 31

```
Leu Thr Pro Glu Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly
Gly Lys 15                      10                      15
Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
      Gin Ala 20          25                      30
His Gly Leu Thr Pro Gin Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn
      Gly Gly 35          40                      45
Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
      Leu Cys 50          55                      60
Gin AlaHisGlyLeuThrProGinGinValValAla lieAlaSerAsn
65          70          75          80
Ser GlyGlyLysGinAlaLeuGluThrValGinArgLeuLeuProVal
      85          90          95
Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gin Val Val Ala
lie Ala
```

100	105	110	
Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg			
Leu Leu			
115	120	125	
Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gin Val			
Val Ala			
130	135	140	
lie Ala SerAsnlie Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val			
GinAla			
145	150	155	160
Leu Leu ProValLeu Cys GinAlaHis Gly LeuThrPro Glu			
GinVal			
165	170	175	
Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu			
Thr Val			
180	185	190	
Gin Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr			
Pro Glu			
195	200	205	
Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala			
Leu Glu			
210	215	220	
Thr Val GinAlaLeu Leu ProValLeu Cys GinAlaHis Gly			
LeuThr			
225	230	235	240
Pro Glu GinValVal Ala lieAlaSer His AspGlyGly Lys			
GinAla			
245	250	255	
Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala			
His Gly			
260	265	270	
Leu Thr Pro Glu Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly			
Gly Lys			
275	280	285	
Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys			

Gin Ala
 290 295 300
 His Gly LeuThrPro Gin GinValVal Ala lieAlaSer Asn
 GlyGly
 305 310 315 320
 Gly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg LeuLeuPro Val
 LeuCys
 325 330 335
 Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gin Val Val Ala lie Ala
 Ser Asn
 340 345 350
 Ser Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Ala Leu Leu
 Pro Val
 355 360 365
 Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gin Val Val Ala
 lie Ala
 370 375 380
 Ser Asn SerGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
 LeuLeu
 385 390 395 400
 Pro Val LeuCysGin Ala HisGlyLeu Thr ProGluGin Val
 ValAla
 405 410 415
 lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 420 425 430
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Glu
 Gin Val
 435 440 445
 Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 450 455 460
 Gin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Ala HisGlyLeu Thr
 ProGlu
 465 470 475 480

<210> 32

<211> 4122

<212> DNA

<213>

Xanthomonas

oryzae <400> 32

atggatccca ttcgttcgcg cacgccaagt cctgcccgcg agcttctgcc
cggaccccaa 60 ccggataggg ttcagccgac tgcagatcgg gggggggctc
cgcttctgg cgccccctg 120 gatggcttgc ccgctcggcg gacgatgtcc
cggacccggc tgccatctcc cctgcgcgcc 180 tcgctcgctt tctcggcggg
cagcttcagc gatctgctcc gtcagttega tccgctcgctt 240 cttgatacat
cgcttcttga ttcgatgcct gccgtcggca cggcgcatac agcggctgcc 300
ccagcagagt gcgatgaggt gcaatcgggt ctgcgtgcag ccgatgaccc
gccacccacc 360 gtgcgtgtcg ctgtcactgc cgcgcggccg ccgcgcgcca
agccggcccc gcgacggcgt 420 gcggcgcaac cctccgacgc ttcgccggcc
gcgcaggtgg atctacgcac gctcggctac 480 agtcagcagc agcaagagaa
gatcaaaccg aaggtgggtt cgacagtggc gcagcaccac 540 gaggcactgg
tgggccatgg gtttacacac gcgcacatcg ttgcgctcag ccgacacccg 600
gcagcgtag ggaccgtgc tgtcaagtat caggacatga tcgcggcggt
accagaggcg 660 acacacgaag acatcggttg tgcggcaaa cagtgggtccg
gcgcacgcgc cctggaggcc 720 ttgctcacgg tggcgggaga gttgagaggt
ccaccgttac agttggacac aggccaactt 780 gtcaagattg caaaacgtgg
cggcgtgacc gcagtggagg cagtgcacgc atcgcgcaat 840 gcaactgacgg
gtgccccctt gaacctgacc ccggcacagg tgggtggccat cgcagcaat 900
aacggtggca agcaggcgct ggagacgggt cagcggctgt tgccggtgct
gtgccaggcc 960 catggcctga ccccggcgca ggtgggtggcc atcgccagcc
acgatggcgg caagcaggca 1020 ctggagacga tgcagcggct
gttgccggtg ctgtgccagg cccatggcct gccccggac 1080
caggtgggtg ccatcgccag caatattggc ggcaagcagg cgctggagac
ggtgcagcgg 1140 ctgttgccgg tgccttgcga ggcccatggc
ctgaccccg accaggtggt ggccatcgcc 1200 agccatggcg
gcggcaagca ggcgctggag acggtgcagc ggctggtgcc ggtgctctgc
1260 caggcccatg gctgacccc ggaccagggt gtggccatcg
ccagccacga tggcggcaag 1320 caggcgctgg agacggtgca
gcggctgttg ccggtgctgt gccaggccca tggcctgacc 1380
ccggaccagg tgggtggccat cgcagcaat ggcggcggca agcaggcgct
ggagacgggt 1440 cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggcc
catggtctga ccccggaaca ggtgggtggcc 1500 atcgccagca
atggcggcaa gcaggcgctg gagacgggtg agcggctggt gccggtgctg
1560 tgccaggccc atggcctgac cccggaccag gtgggtggcca
tcgccagcca cgatggcggc 1620 aagcaggcgc tggagacgggt

gcagcggctg ttgccggtgc tgtgccagac ccatggctctg 1680
accccggcgc aggtggtggc catcgccagc cacgatggcg gcaagcaggc
gctggagacg 1740 gtgcagcagc tgttgccggt gctgtgccag
gcccattggc tgaccccgga ccaggtggtg 1800 gccatcgcca
gcaatattgg cggcaagcag gcgctagcga cggcgcagcg gctgttgccg
1860 gtgctgtgcc aagcccatgg cctgaccccg gaccaggtgg
tggccatcgc cagcaatggc 1920 ggcggaagc aggcgctgga
gacggtgcag cggctgttgc cggcgtgtgtg ccaggcccat 1980
ggcctgaccc cggaccaggt ggtggccatc gccagcaatg gcggcgga
gcaggcgctg 2040 gagacggtgc agcggtgtgtt gccggtgctg
tgccaggccc atggtctgac ccaggtgcag 2100 gtggtggcca
tcgccagcaa tattggcggc aagcaggcgc tggagacggt gcagcggctg
2160 ttgccggtgc tgtgccaggc ccatggcctg acccggcgc
aggtggtggc catcgccagc 2220 cacgatggcg gcaagcaggc
gctggagacg gtgcagcggc tgttgccggt gctgtgccag 2280
gcccattggc tgaccccgga ccaagtgtgtg gccatcgcca gcaatggcgg
cggcaagcag 2340 gcgctggaga cggcgcagcg gctgttgccg
gtgctgtgcc aggcccatgg cctgaccag 2400 gagcaggtgg
tggccatcgc cagcaataac ggcggaagc aggcgctgga gacggtgcag
2460 cggctgttgc cggcgtgtgtg ccaggcccat ggccctgaccc
cggaccaggt ggtggccatc 2520 gccagcaatg gcggcgga
gcaggcgctg gagacggtgc agcggtgtgtt gccggtgctg 2580
tgccaggccc atggtctgac ccggcgcgag gtggtggcca tcgccagcaa
tattggcggc 2640 aagcaggcgc tggagacggt gcagcggctg
ttgccggtgc tgtgccagga ccatggcctg 2700 accctggcgc
aggtggtggc catcgccagc aatattggcg gcaagcaggc gctggagacg
2760 gtgcagcggc tgttgccggt gctgtgccag gcacatggcc
tgaccagga ccaggtggtg 2820 gccatcgcca gcaatattgg
cggcaagcag gcgctggaga cggcgcagcg gctgttgccg 2880
gtgctgtgcc aggaccatgg cctgaccccg gaccaggtcg tggccatcgc
cagcaatatt 2940 ggcggaagc aggcgctgga gacggtgcag
cggctgttgc cggcgtgtgtg ccaggaccat 3000 ggccctgaccc
tggaccaggt ggtggccatc gccagcaatg gcggcaagca ggcgctggag
3060 acggtgcagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggaccatg
gactgacccc ggaccaggtc 3120 gtggccatcg ccagcaatag

tggcggcaag caggcgctgg agacggtgca gcggctgttg 3180
ccggtgctgt gccaggacca tggcctgacc ccgaaccagg tggtagccat
cgccagcaat 3240 ggcggcaagc aggcgctgga gagcattgtt
gcccagttat ctgcacctga tccggcgttg 3300

gccgcgttga ccaacgacca cctcgtcgcc ttggcctgcc tcggcggacg
 tcctgccatg 3360 gatgcagtga aaaagggtatt gccgcacgcg
 ccggaattga tcagaagagt caatcgccgt 3420 attggcgaac
 gcacgtccca tcgcgttgcc gactacgcgc aagtggttcg cgtgctggag
 3480 tttttccagt gccactccca cccagcgtac gcatttgatg
 aggccatgac gcagttcggg 3540 atgagcagga acgggttggt
 acagctcttt cgcagagtgg gcgtcaccca actcgaagcc 3600
 cgcggtggaa cgctcccccc agcctcgag cgttgggacc gtatcctcca
 ggcatcaggg 3660 atgaaaaggg ccaaaccgtc cctacttca
 gctcaaacac cggatcaggc gtctttgcat 3720 gcattcgccg
 attcgctgga gcgtgacctt gatgcgccta gcccaatgca cgaggagat
 3780 cagacagggg caagcagccg taaacgggtcc cgatcggatc
 gtgctgtcac cgccccctcc 3840 gcacagcact ctttcgaggt
 gcgcgttccc gaacagcgcg atgcgctgca tttgcccctc 3900
 agctggaggg taaaacgccc gcgtaccagg atcgggggcg gcctcccgga
 tcctggtacg 3960 cccatcgctg ccgacctggc agcgtccagc
 accgtgatgt gggaacaaga tgcgggcccc 4020 ttgcgagggg
 cagcggatga ttccccggca ttcaacgaag aggagctcgc atggttgatg
 4080 gagctattgc ctcagtcagg ctcagtcggg gggacgatct ga

41

22

<210> 33

<211> 1341

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 33

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
 Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
 Ser Arg Thr 20 25 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
 Gly Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Pro Pro Ala Gly Gly
 Pro Leu
 50 55 60
 Asp GlyLeuProAlaArgArgThrMetSerArg ThrArgLeuProSer
 65 70 75 80
 Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSerAspLeu
 85 90 95
 Leu Arg Gin Phe Asp Pro Ser Leu Phe Asn Thr Ser Leu Phe
 Asp Ser
 100 105 110
 Leu Pro Pro Phe Gly Ala His His Thr Glu Ala Ala Thr Gly
 Glu Trp
 115 120 125
 Asp Glu Val Gin Ser Gly Leu Arg Ala Ala Asp Ala Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Met ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
 145 150 155 160
 Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAlaAlaGin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro
 210 215 220

Ala AlaLeu Gly Thr Val Ala Val Lys TyrGin AspMet lieAlaAla
 225 230 235 240
 Leu ProGluAla Thr His GluAla lieValGly ValGly LysGinTrp
 245 250 255
 Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Val Ala Gly
 Glu Leu
 260 265 270
 Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Leu Lys
 lie Ala
 275 280 285
 Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp
 Arg Asn
 290 295 300
 Ala Leu Thr Gly Ala Pro Leu Asn Leu Thr Pro Glu Gin Val
 Val Ala

305	310	315	320
lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val			
Gin Arg			
	325	330	335
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Gin			
Gin Val			
	340	345	350
Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu			
Thr Val			
	355	360	365
Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr			
Pro Gin			
	370	375	380
Gin Val ValAlaAla lie Ala SerAsnSer Gly GlyLysGin Ala			
LeuGlu			
	385	390	395
Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAlaHis Gly			
LeuThr			
	405	410	415
Pro Glu Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys			
Gin Ala			
	420	425	430
Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala			
His Gly			
	435	440	445
Leu Thr Pro Glu Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly			
Gly Lys			
	450	455	460
Gin Ala LeuGluThr Val GinAlaLeu Leu ProValLeu Cys			
GinAla			
	465	470	475
His Gly LeuThrPro Glu GinValVal Ala lieAlaSer Asn			
lieGly			
	485	490	495
Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Ala Leu Leu Pro Val			

Leu Cys
 500 505 510
 Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gin Val Val Ala lie Ala
 Ser Asn
 515 520 525
 lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Ala Leu Leu
 Pro Val
 530 535 540
 Leu Cys GinAlaHis Gly LeuThrPro Glu GinValVal Ala
 lieAla
 545 550 555 560
 Ser His AspGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
 LeuLeu
 565 570 575
 Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gin Val
 Val Ala
 580 585 590
 lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 595 600 605
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Gin
 Gin Val
 610 615 620
 Val Ala lieAlaSer Asn GlyGlyGly Lys GinAlaLeu Glu
 ThrVal
 625 630 635 640
 Gin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Ala HisGlyLeu Thr
 ProGlu
 645 650 655
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Ser Gly Gly Lys Gin Ala
 Leu Glu
 660 665 670
 Thr Val Gin Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly
 Leu Thr
 675 680 685

Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	Asn	Ser	Gly	Gly	Lys
Gln	Ala												
690					695					700			
Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gln	Ala
		His	Gly										
705					710				715			720	
Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	His	Asp	Gly
		Gly	Lys										
					725				730			735	
Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys
Gln	Ala												
					740				745			750	
His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	His
Asp	Gly												
					755				760			765	
Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu	Pro	Val
Leu	Cys												
					770				775			780	
Gln	Ala	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Val	Val	Ala	lie	Ala
		Ser	His										
785					790				795			800	
Asp	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gln	Arg	Leu	Leu
		Pro	Val										
					805				810			815	

Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Gin Gin Val
 Val Ala lie Ala 820 825
 830
 Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg
 Leu Leu 835 840 845
 Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gin Val
 Val Ala
 850 855 860
 lie Ala SerHisAspGlyGlyLysGinAlaLeuGluThrValGin Arg
 865 870 875 880
 Leu Leu ProValLeuCysGinAlaHisGlyLeuThrProGinGin Val
 885 890 895
 Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala Leu Glu
 Ser lie
 900 905 910
 Val Ala Gin Leu Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu
 Thr Asn
 915 920 925
 Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala
 Leu Asp
 930 935 940
 Ala Val LysLysGlyLeuProHisAlaProAlaLeulieLysArg Thr
 945 950 955 960
 Asn ArgArglieProGluArgThrSerHisArgValAlaAspHisAla
 965 970 975
 Gin Val Val Arg Val Leu Gly Phe Phe Gin Cys His Ser His
 Pro Ala
 980 985 990
 Gin Ala Phe Asp Asp Ala Met Thr Gin Phe Gly Met Ser Arg
 His Gly
 995 1000 1005
 Leu Leu Gin Leu Phe Arg Arg Val Gly Val Thr Glu Leu Glu
 Ala Arg
 1010 1015 1020
 Ser Gly Thr LeuPro Pro Ala Ser GinArgTrp Asp Arg

lieLeu Gin
 1025 1030 1035 1040
 Ala Ser Gly MetLys Arg Ala Lys ProSerPro Thr Ser
 ThrGin Thr
 1045 1050 1055
 Pro Asp Gin Ala Ser Leu His Ala Phe Ala Asp Ser Leu Glu
 Arg Asp
 1060 1065 1070
 Leu Asp Ala Pro Ser Pro Met His Glu Gly Asp Gin Thr Arg
 Ala Ser
 1075 1080 1085
 Ser Arg Lys Arg Ser Arg Ser Asp Arg Ala Val Thr Gly Pro
 Ser Ala
 1090 1095 1100
 Gin Gin Ser Phe Glu Val Arg Val Pro Glu Gin Arg Asp Ala
 Leu His 1105 1110 1115 1120
 Leu Pro Leu Ser Trp Arg Val Lys Arg Pro Arg Thr Ser lie
 Gly Gly
 1125 1130 1135
 Gly Leu Pro Asp Pro lie Ser Arg Ser Gin Leu Val Lys Ser
 Glu Leu
 1140 1145 1150
 Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val
 Pro His
 1155 1160 1165
 Glu Tyr lie Glu Leu lie Glu lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin
 Asp Arg
 1170 1175 1180
 lie Leu Glu MetLys Val Met Glu PhePheMet Lys Val
 TyrGly Tyr
 1185 1190 1195 1200
 Arg Gly Lys HisLeu Gly Gly Ser ArgLysPro Asp Gly
 Alalie Tyr
 1205 1210 1215
 Thr Val Gly Ser Pro lie Asp Tyr Gly Val lie Val Asp Thr

Lys Ala

1220

1225

1230

Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro lie Gly Gin Ala Asp Glu
Met Gin

1235

1240

1245

Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gin Thr Arg Asn Lys His lie Asn
Pro Asn

1250

1255

1260

Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys
Phe Leu 1265 1270 1275 1280
Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu
Thr Arg

1285

1290

1295

Leu Asn His lie Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val
Glu Glu

1300

1305

1310

Leu Leu lie Gly Gly Glu Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr
Leu Glu

1315

1320

1325

Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu lie Asn Phe

1330

1335

1340

<210> 34

<211> 1542

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 34

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
Trp Lys Asp 15 10 15
Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
Pro Arg Arg 20 25 30
Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
Arg Val 35 40 45
Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
Pro Leu
50 55 60
Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeuProSer
65 70 75 80
Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSerAspLeu
85 90 95
Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
Asp Ser
100 105 110
Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
Glu Trp
115 120 125
Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
Pro Thr
130 135 140
Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
145 150 155 160
Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAlaAlaGin
165 170 175
Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
Lys lie
180 185 190
Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
Leu Val
195 200 205
Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
His Pro
210 215 220

Ala AlaLeuGlyThrValAlaValThrTyrGinHislie lie ThrAla
 225 230 235 240
 Leu ProGluAlaThrHisGluAsplieValGlyValGlyLysGinTrp
 245 250 255
 Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly
 Glu Leu
 260 265 270
 Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys
 lie Ala
 275 280 285
 Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
 Arg Asn
 290 295 300
 Ala LeuThrGlyAlaProLeuAsnLeuThrProAlaGinValValAla
 305 310 315 320
 lie AlaSerAsnAsnGlyGlyLysGinAlaLeuGluThrValGinArg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Ala
 Gin Val
 340 345 350
 Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Met
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Pro
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala
 Leu Glu

385		390		395		400
Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly						
Leu Thr						
	405		410		415	
Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Gly Gly Gly Lys						
Gin Ala						
	420		425		430	
Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala						
His Gly						
	435		440		445	
Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly						
Gly Lys						
	450		455		460	
Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys						
GinAla						
465		470		475		480
His Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala lieAlaSer Asn						
GlyGly						
	485		490		495	
Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val						
Leu Cys						
	500		505		510	
Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala						
Ser Asn						
	515		520		525	
Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro						
Val Leu						
	530		535		540	
Cys Gin AlaHisGly Leu ThrProAsp Gin ValValAla lie						
AlaSer						
545		550		555		560
His Asp GlyGlyLys Gin AlaLeuGlu Thr ValGinArg Leu						
LeuPro						
	565		570		575	
Val Leu Cys Gin Thr His Gly Leu Thr Pro Ala Gin Val Val						

Ala lie

580 585 590

Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin
Gin Leu

595 600 605

Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Asp Gin
Val Val

610 615 620

Ala lie AlaSerAsn lie GlyGlyLys Gin AlaLeuAla Thr
ValGin

625 630 635 640

Arg Leu LeuProVal Leu CysGinAla His GlyLeuThr Pro
AspGin

645 650 655

Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu
Glu Thr

660 665 670

Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu
Thr Pro

675 680 685

Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin
Ala Leu

690 695 700

Glu Thr ValGinArg Leu LeuProVal Leu CysGinAla His
GlyLeu

705 710 715 720

Thr Gin ValGinVal Val AlalieAla Ser AsnlieGly Gly
LysGin

725 730 735

Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin
Ala His

740 745 750

Gly Leu Thr Pro Ala Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp
Gly Gly

755 760 765

Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu
 Cys Gin
 770 775 780
 Ala His GlyLeuThr Pro AspGinVal Val AlalieAla Ser
 AsnGly
 785 790 795 800
 Gly Gly LysGinAla Leu GluThrVal Gin ArgLeuLeu Pro
 ValLeu
 805 810 815
 Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Gin Glu Gin Val Val Ala lie
 Ala Ser
 820 825 830
 Asn Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu
 Leu Pro
 835 840 845
 Val Leu Cys Gin Ala His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val
 Ala lie
 850 855 860
 Ala Ser AsnGlyGly Gly LysGinAla Leu GluThrVal Gin
 ArgLeu
 865 870 875 880
 Leu Pro ValLeuCys Gin AlaHisGly Leu ThrProAla Gin
 ValVal
 885 890 895

Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu
 Glu Thr Val Gin 900 905
 910
 Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Leu
 Ala Gin 915 920 925
 Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu
 Glu Thr
 930 935 940
 Val Gin ArgLeuLeuProValLeuCysGinAlaHisGlyLeuThr Gin
 945 950 955 960
 Asp Gin ValValAla lieAlaSerAsnlieGlyGlyLysGinAla Leu
 965 970 975
 Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His
 Gly Leu
 980 985 990
 Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly
 Lys Gin
 995 1000 1005
 Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin
 Asp His
 1010 1015 1020
 Gly Leu Thr Leu Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly
 Gly Lys 1025 1030 1035 1040
 Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 Gin Asp
 1045 1050 1055
 His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn
 Ser Gly
 1060 1065 1070
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 1075 1080 1085
 Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asn Gin Val Val Ala lie Ala
 Ser Asn
 1090 1095 1100

Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Ser lie Val Ala Gin Leu Ser
 Arg Pro 1105 1110 1115 1120
 Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala
 Leu Ala
 1125 1130 1135
 Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Met Asp Ala Val Lys Lys Gly
 Leu Pro
 1140 1145 1150
 His Ala Pro Glu Leu lie Arg Arg Val Asn Arg Arg lie Gly
 Glu Arg
 1155 1160 1165
 Thr Ser His Arg Val Ala Asp Tyr Ala Gin Val Val Arg Val
 Leu Glu
 1170 1175 1180
 Phe Phe Gin Cys His Ser His Pro Ala Tyr Ala Phe Asp Glu
 Ala Met 1185 1190 1195 1200
 Thr Gin Phe Gly Met Ser Arg Asn Gly Leu Val Gin Leu Phe
 Arg Arg
 1205 1210 1215
 Val Gly Val Thr Glu Leu Glu Ala Arg Gly Gly Thr Leu Pro
 Pro Ala
 1220 1225 1230
 Ser Gin Arg Trp Asp Arg lie Leu Gin Ala Ser Gly Met Lys
 Arg Ala
 1235 1240 1245
 Lys Pro Ser Pro Thr Ser Ala Gin Thr Pro Asp Gin Ala Ser
 Leu His
 1250 1255 1260
 Ala Phe Ala AspSer Leu Glu Arg AspLeuAsp Ala Pro
 SerPro Met
 1265 1270 1275 1280
 His Glu Gly AspGin Thr Arg Ala SerSerArg Lys Arg
 SerArg Ser
 1285 1290 1295
 Asp Arg Ala Val Thr Gly Pro Ser Ala Gin Gin Ala Val Glu

Val Arg
 1300 1305 1310
 Val Pro Glu Gin Arg Asp Ala Leu His Leu Pro Leu Ser Trp
 Arg Val
 1315 1320 1325
 Lys Arg Pro Arg Thr Arg lie Trp Gly Gly Leu Pro Asp Pro
 lie Ser
 1330 1335 1340
 Arg Ser Gin Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser
 Glu Leu 1345 1350 1355 1360
 Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr lie Glu Leu
 lie Glu
 1365 1370 1375
 lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin Asp Arg lie Leu Glu Met Lys
 Val Met
 1380 1385 1390
 Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu
 Gly Gly

1395	1400	1405
Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala lie Tyr Thr Val Gly Ser Pro		
lie Asp		
1410	1415	1420
Tyr Gly Val lie Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr		
Asn Leu 1425	1430	1435 1440
Pro lie Gly Gin Ala Asp Glu Met Gin Arg Tyr Val Glu Glu		
Asn Gin		
1445	1450	1455
Thr Arg Asn Lys His lie Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val		
Tyr Pro		
1460	1465	1470
Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His		
Phe Lys		
1475	1480	1485
Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu Thr Arg Leu Asn His lie Thr		
Asn Cys		
1490	1495	1500
Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu lie Gly Gly		
Glu Met 1505	1510	1515 1520
lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys		
Phe Asn		
1525	1530	1535
Asn Gly Glu lie Asn Phe		

1540

<210> 35

<211> 1035

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 35

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
 Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
 Pro Arg Arg 20 25 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
 Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu
 50 55 60
 Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeuProSer
 65 70 75 80
 Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSerAspLeu
 85 90 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
 Asp Ser
 100 105 110
 Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 Glu Trp
 115 120 125
 Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
 145 150 155 160
 Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAlaAlaGin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro
 210 215 220

Ala	Ala	Leu	Gly	Thr	Val	Ala	Val	Thr	Tyr	Gln	His	Leu	Leu	Thr	Ala
225					230					235					240
Leu	Pro	Glu	Ala	Thr	His	Glu	Asp	Leu	Val	Gly	Val	Gly	Lys	Gln	Trp
				245					250					255	
Ser	Gly	Ala	Arg	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Thr	Asp	Ala	Gly		
Glu	Leu														

260	265	270
Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys		
lie Ala		
275	280	285
Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser		
Arg Asn		
290	295	300
Ala Leu ThrGlyAla Pro LeuAsnLeu Thr ProAlaGin Val		
ValAla		
305	310	315
lie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val		
GinArg		
325	330	335
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp		
Gin Val		
340	345	350
Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu		
Thr Val		
355	360	365
Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr		
Pro Asp		
370	375	380
Gin Val ValAlaAlie Ala AsnAsnAsn Gly GlyLysGin Ala		
LeuGlu		
385	390	395
Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly		
LeuThr		
405	410	415
Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys		
Gin Ala		
420	425	430
Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp		
His Gly		
435	440	445
Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly		

Gly Lys
 450 455 460
 Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys
 GinAsp
 465 470 475 480
 His Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala lieAlaSer Asn
 GlyGly
 485 490 495
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 500 505 510
 Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
 Asn Asn
 515 520 525
 Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
 Pro Val
 530 535 540
 Leu Cys GinAspHis Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala
 lieAla
 545 550 555 560
 Ser His AspGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
 LeuLeu
 565 570 575
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 580 585 590
 lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Ser lie
 Val Ala
 595 600 605
 Gin Leu Ser Arg Arg Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn
 Asp His
 610 615 620
 Leu Val AlaLeuAla Cys LeuGlyGly Arg ProAlaLeu Asp
 AlaVal
 625 630 635 640

Lys	Lys	Gly	Leu	Pro	His	Ala	Pro	Glu	Phe	lie	Arg	Arg	Val
	Asn	Arg											
		645				650				655			
Arg	lie	Ala	Glu	Arg	Thr	Ser	His	Arg	Val	Ala	Asp	Tyr	Ala
His	Val												
		660				665				670			
Val	Arg	Val	Leu	Glu	Phe	Phe	Gin	Cys	His	Ser	His	Pro	Ala
His	Ala												
		675				680				685			
Phe	Asp	Glu	Ala	Met	Thr	Gin	Phe	Gly	Met	Ser	Arg	His	Gly
Leu	Val												
		690				695				700			
Gin	Leu	Phe	Arg	Arg	Val	Gly	Val	Thr	Glu	Phe	Glu	Ala	Arg
		Tyr	Gly										
705					710				715				720
Thr	Leu	Pro	Pro	Ala	Ser	Gin	Arg	Trp	Asp	Arg	lie	Leu	Gin
		Ala	Ser										
		725				730				735			
Gly	Met	Lys	Arg	Ala	Lys	Pro	Ser	Pro	Thr	Ser	Ala	Gin	Thr
Pro	Asp												
		740				745				750			
Gin	Thr	Ser	Leu	His	Ala	Phe	Ala	Asp	Ser	Leu	Glu	Arg	Asp
Leu	Asp												
		755				760				765			

Ala Pro Ser Pro Met His Glu Gly Asp Gin Thr Arg Ala Ser
Ser Arg

770 775 780
Lys ArgSerArgSerAsp Arg AlaValThr Gly ProSerAla Gin
Gin

785 790 795 800
Ala ValGluValArgVal Pro GluGinArg Asp AlaLeuHis Leu
Pro

805 810 815
Leu Ser Trp Arg Val Lys Arg Pro Arg Thr Arg lie Trp Gly
Gly Leu

820 825 830
Pro Asp Pro lie Ser Arg Ser Gin Leu Val Lys Ser Glu Leu
Glu Glu

835 840 845
Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His
Glu Tyr

850 855 860
lie GluLeulieGlulie Ala ArgAsnSer Thr GinAspArg lie
Leu

865 870 875 880
Glu MetLysValMetGlu Phe PheMetLys Val TyrGlyTyr Arg
Gly

885 890 895
Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala lie Tyr
Thr Val

900 905 910
Gly Ser Pro lie Asp Tyr Gly Val lie Val Asp Thr Lys Ala
Tyr Ser

915 920 925
Gly Gly Tyr Asn Leu Pro lie Gly Gin Ala Asp Glu Met Gin
Arg Tyr

930 935 940
Val GluGluAsnGinThr Arg AsnLysHis lie AsnProAsn Glu

Trp
 945 950 955 960
 Trp LysVal TyrProSer Ser Val ThrGlu Phe Lys PheLeu Phe
 Val
 965 970 975
 Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu Thr Arg
 Leu Asn
 980 985 990
 His lie Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu
 Leu Leu
 995 1000 1005
 lie Gly Gly Glu Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu
 Glu Val
 1010 1015 1020
 Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu lie
 Asn Phe 1025 1030 1035

<210> 36

<211> 1069

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 36

Met	Ala	Ser	Ser	Pro	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Ser			
Trp	Lys	Asp	15			10				15					
Ala	Ser	Gly	Trp	Ser	Arg	Met	His	Ala	Asp	Pro	lie	Arg			
				Pro	Arg	Arg	20	25			30				
Pro	Ser	Pro	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Gly	Pro	Gin	Pro			
		Asp	Arg	Val	35	40			45						
Gin	Pro	Thr	Ala	Asp	Arg	Gly	Val	Ser	Ala	Pro	Ala	Gly	Ser		
	Pro	Leu	50		55				60						
Asp	Gly	Leu	Pro	Ala	Arg	Arg	Thr	Val	Ser	Arg	Thr	Arg	Leu	Pro	Ser
65					70				75					80	
Pro	Pro	Ala	Pro	Ser	Pro	Ala	Phe	Ser	Ala	Gly	Ser	Phe	Ser	Asp	Leu
					85				90					95	
Leu	Arg	Pro	Phe	Asp	Pro	Ser	Leu	Leu	Asp	Thr	Ser	Leu	Leu		
Asp	Ser														
					100				105					110	
Met	Pro	Ala	Val	Gly	Thr	Pro	His	Thr	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala		
Glu	Trp														
					115				120					125	
Asp	Glu	Ala	Gin	Ser	Ala	Leu	Arg	Ala	Ala	Asp	Asp	Pro	Pro		
Pro	Thr														
					130				135					140	

Val	Arg	Val	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Arg	Pro	Pro	Arg	Ala	Lys	Pro	
Ala															
145					150					155					160
Pro	Arg	Arg	Arg	Ala	Ala	Gln	Pro	Ser	Asp	Ala	Ser	Pro	Ala		
AlaGln															
				165					170					175	
Val	Asp	Leu	Arg	Thr	Leu	Gly	Tyr	Ser	Gln	Gln	Gln	Gln	Glu		
Lys lie															
				180					185					190	
Lys	Pro	Lys	Val	Arg	Ser	Thr	Val	Ala	Gln	His	His	Glu	Ala		
Leu Val															
				195					200					205	
Gly	His	Gly	Phe	Thr	His	Ala	His	lie	Val	Ala	Leu	Ser	Gln		
His Pro															
				210					215					220	
Ala	Ala	Leu	Gly	Thr	Val	Ala	Val	Thr	Tyr	Gln	His	lie	lie		
ThrAla															
225					230					235					240
Leu	Pro	Glu	Ala	Thr	His	Glu	Asp	lie	Val	Gly	Val	Gly	Lys		
GlnTrp															
				245					250					255	
Ser	Gly	Ala	Arg	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Thr	Asp	Ala	Gly		
Glu Leu															
				260					265					270	
Arg	Gly	Pro	Pro	Leu	Gln	Leu	Asp	Thr	Gly	Gln	Leu	Val	Lys		
lie Ala															
				275					280					285	
Lys	Arg	Gly	Gly	Val	Thr	Ala	Met	Glu	Ala	Val	His	Ala	Ser		
Arg Asn															
				290					295					300	
Ala	Leu	Thr	Gly	Ala	Pro	Leu	Asn	Leu	Thr	Pro	Ala	Gln	Val		
ValAla															
305					310					315					320
lie	Ala	Ser	Asn	lie	Gly	Gly	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Thr	Val		

GinArg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 340 345 350
 Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin Val ValAlalialie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala
 LeuGlu
 385 390 395 400
 Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly
 LeuThr
 405 410 415
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 Gin Ala
 420 425 430
 Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly
 435 440 445
 Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly
 Gly Lys
 450 455 460
 Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys
 GinAsp
 465 470 475 480
 His Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala lieAlaSer Asn
 GlyGly
 485 490 495
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 500 505 510

Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
Ser His

515

520

525

Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
Pro Val

530

535

540

Leu Cys GinAspHis Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala
lieAla

545

550

555

560

Ser Asn GlyGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
LeuLeu

565

570

575

Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
Val Ala

580

585

590

lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
Gin Arg

595

600

605

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
Gin Val

610

615

620

Val Ala lieAlaSer His AspGlyGly Lys GinAlaLeu Glu
Serlie

625

630

635

640

Val Ala GinLeuSer Arg ArgAspPro Ala LeuAlaAla Leu
ThrAsn

645	650	655
Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala		
Leu Asp		
660	665	670
Ala Val Lys Lys Gly Leu Pro His Ala Pro Glu Phe lie Arg		
Arg Val		
675	680	685
Asn Arg Arg lie Ala Glu Arg Thr Ser His Arg Val Ala Asp		
Tyr Ala		
690	695	700
His ValValArgValLeu Glu Phe PheGin Cys HisSerHis Pro		
Ala		
705	710	715
His AlaPheAspGluAla Met ThrGinPhe Gly MetSerArg His		
Gly		
725	730	735
Leu Val Gin Leu Phe Arg Arg Val Gly Val Thr Glu Phe Glu		
Ala Arg		
740	745	750
Tyr Gly Thr Leu Pro Pro Ala Ser Gin Arg Trp Asp Arg lie		
Leu Gin		
755	760	765
Ala Ser Gly Met Lys Arg Ala Lys Pro Ser Pro Thr Ser Ala		
Gin Thr		
770	775	780
Pro AspGinThrSerLeu His AlaPheAla Asp SerLeuGlu Arg		
Asp		
785	790	795
Leu AspAlaProSerPro Met HisGluGly Asp GinThrArg Ala		
Ser		
805	810	815
Ser Arg Lys Arg Ser Arg Ser Asp Arg Ala Val Thr Gly Pro		
Ser Ala		
820	825	830
Gin Gin Ala Val Glu Val Arg Val Pro Glu Gin Arg Asp Ala		

Leu His
 835 840 845
 Leu Pro Leu Ser Trp Arg Val Lys Arg Pro Arg Thr Arg lie
 Trp Gly
 850 855 860
 Gly LeuProAspProlie Ser ArgSerGin Leu ValLysSer Glu
 Leu
 865 870 875 880
 Glu GluLysLysSerGlu Leu ArgHisLys Leu LysTyrVal Pro
 His
 885 890 895
 Glu Tyr lie Glu Leu lie Glu lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin
 Asp Arg
 900 905 910
 lie Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr
 Gly Tyr
 915 920 925
 Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala
 lie Tyr
 930 935 940
 Thr ValGlySerProlie Asp TyrGlyVal lie ValAspThr Lys
 Ala
 945 950 955 960
 Tyr SerGlyGlyTyrAsn Leu ProlieGly Gin AlaAspGlu Met
 Gin
 965 970 975
 Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gin Thr Arg Asn Lys His lie Asn
 Pro Asn
 980 985 990
 Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys
 Phe Leu
 995 1000 1005
 Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu
 Thr Arg
 1010 1015 1020

Leu Asn His lie Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val
 Glu Glu 1025 1030 1035 1040
 Leu Leu lie Gly Gly Glu Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr
 Leu Glu
 1045 1050 1055
 Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu lie Asn Phe
 1060 1065

<210> 37

<211> 1137

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 37

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 Ser Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie
 Arg Pro Arg Arg 20 25
 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
 Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu
 50 55 60
 Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeuProSer
 65 70 75 80
 Pro Pro AlaProSerProAlaPheSerAla GlySerPheSerAsp Leu
 85 90 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
 Asp Ser
 100 105 110
 Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 Glu Trp
 115 120 125
 Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
 145 150 155 160
 Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAlaAlaGin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro

210	215	220	
Ala AlaLeuGlyThrValAlaValThrTyrGinHis	lie	lie	ThrAla
225	230	235	240
Leu Pro	GluAlaThrHisGluAsplieVal	GlyValGlyLysGin	Trp
	245	250	255
Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly			
Glu Leu			
	260	265	270
Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys			
lie Ala			
	275	280	285
Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser			
Arg Asn			
	290	295	300
Ala LeuThrGlyAlaProLeuAsnLeuThrProAlaGinValValAla			
305	310	315	320
lie Ala	SerAsnlieGlyGlyLysGinAlaLeuGluThrValGin		Arg
	325	330	335
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp			
Gin Val			
	340	345	350
Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu			
Thr Val			
	355	360	365
Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr			
Pro Asp			
	370	375	380
Gin Val	ValAlalieAlaSerHisAspGlyGlyLysGinAlaLeu		Glu
385	390	395	400
Thr Val	GinArgLeuLeuProValLeuCysGinAspHisGlyLeu		Thr
	405	410	415
Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys			
Gin Ala			
	420	425	430
Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp			

His Gly
 435 440 445
 Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly
 Gly Lys
 450 455 460
 Gin AlaLeuGluThrValGinArgLeuLeuPro Val LeuCysGinAsp
 465 470 475 480
 His GlyLeuThrProAspGinValValAlalieu AlaAsnAsnAsnGly
 485 490 495

Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
 Pro Val Leu Cys 500 505
 510
 Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
 Ser Asn 515 520 525
 lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
 Pro Val
 530 535 540
 Leu Cys GinAspHis Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala
 lieAla
 545 550 555 560
 Ser Asn GlyGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
 LeuLeu
 565 570 575
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 580 585 590
 lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 595 600 605
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 610 615 620
 Val Ala lieAlaSer His AspGlyGly Lys GinAlaLeu Glu
 ThrVal
 625 630 635 640
 Gin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Asp HisGlyLeu Thr
 ProAsp
 645 650 655
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala
 Leu Glu
 660 665 670
 Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly
 Leu Thr
 675 680 685

Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 Gin Ala
 690 695 700
 Leu Glu Ser lie Val Ala Gin Leu Ser Arg Arg Asp Pro Ala
 Leu Ala
 705 710 715 720
 Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly
 Gly Arg
 725 730 735
 Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Pro His Ala Pro
 Glu Phe
 740 745 750
 lie Arg Arg Val Asn Arg Arg lie Ala Glu Arg Thr Ser His
 Arg Val
 755 760 765
 Ala Asp Tyr Ala His Val Val Arg Val Leu Glu Phe Phe Gin
 Cys His
 770 775 780
 Ser His Pro Ala His Ala Phe Asp Glu Ala Met Thr Gin Phe
 Gly Met
 785 790 795 800
 Ser Arg His Gly Leu Val Gin Leu Phe Arg Arg Val Gly Val
 Thr Glu
 805 810 815
 Phe Glu Ala Arg Tyr Gly Thr Leu Pro Pro Ala Ser Gin Arg
 Trp Asp
 820 825 830
 Arg lie Leu Gin Ala Ser Gly Met Lys Arg Ala Lys Pro Ser
 Pro Thr
 835 840 845
 Ser Ala Gin Thr Pro Asp Gin Thr Ser Leu His Ala Phe Ala
 Asp Ser
 850 855 860
 Leu Glu Arg Asp Leu Asp Ala Pro Ser Pro Met His Glu Gly
 Asp Gin

865		870		875		880
Thr Arg	AlaSerSer Arg	LysArgSer Arg	SerAspArg	Ala		
	ValThr					
	885	890	895			
Gly Pro Ser Ala Gin Gin Ala Val Glu Val Arg Val Pro Glu						
Gin Arg						
	900	905	910			
Asp Ala Leu His Leu Pro Leu Ser Trp Arg Val Lys Arg Pro						
Arg Thr						
	915	920	925			
Arg lie Trp Gly Gly Leu Pro Asp Pro lie Ser Arg Ser Gin						
Leu Val						
	930	935	940			
Lys Ser GluLeuGlu Glu LysLysSer Glu LeuArgHis Lys						
	LeuLys					
945	950	955	960			
Tyr Val ProHisGlu Tyr lieGluLeu lie GlulieAla Arg						
	AsnSer					
	965	970	975			
Thr Gin Asp Arg lie Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe						
Met Lys						
	980	985	990			
Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys						
Pro Asp						

995	1000	1005
Gly Ala lie Tyr Thr Val Gly Ser Pro lie Asp Tyr Gly Val		
lie Val		
1010	1015	1020
Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro lie Gly		
Gin Ala 1025	1030	1035 1040
Asp Glu Met Gin Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gin Thr Arg Asn		
Lys His		
1045	1050	1055
lie Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val		
Thr Glu		
1060	1065	1070
Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr		
Lys Ala		
1075	1080	1085
Gin Leu Thr Arg Leu Asn His lie Thr Asn Cys Asn Gly Ala		
Val Leu		
1090	1095	1100
Ser Val Glu GluLeu Leu lie Gly GlyGluMet lie Lys		
AlaGly Thr		
1105	1110	1115 1120
Leu Thr Leu GluGlu Val Arg Arg Lys PheAsn Asn Gly		
Glulie Asn		
1125	1130	1135
Phe		

<210> 38

<211> 1137

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 38

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
 Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
 Pro Arg Arg 20 25 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
 Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu
 50 55 60
 Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeuProSer
 65 70 75 80
 Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSerAspLeu
 85 90 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
 Asp Ser
 100 105 110
 Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 Glu Trp
 115 120 125
 Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
 145 150 155 160
 Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAlaAlaGin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro
 210 215 220

Ala	Ala	Leu	Gly	Thr	Val	Ala	Val	Thr	Tyr	Gln	His	Leu	Leu	Thr	Ala
225					230					235					240
Leu	Pro	Glu	Ala	Thr	His	Glu	Asp	Leu	Val	Gly	Val	Gly	Lys	Gln	Trp
				245					250					255	
Ser	Gly	Ala	Arg	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Thr	Asp	Ala	Gly		
Glu	Leu														

260	265	270
Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys		
lie Ala		
275	280	285
Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser		
Arg Asn		
290	295	300
Ala Leu ThrGlyAla Pro LeuAsnLeu Thr ProAlaGin Val		
ValAla		
305	310	315
lie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val		
GinArg		
325	330	335
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp		
Gin Val		
340	345	350
Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu		
Thr Val		
355	360	365
Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr		
Pro Asp		
370	375	380
Gin Val ValAlaAlie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala		
LeuGlu		
385	390	395
Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly		
LeuThr		
405	410	415
Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys		
Gin Ala		
420	425	430
Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp		
His Gly		
435	440	445
Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly		

Gly Lys
 450 455 460
 Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys
 GinAsp
 465 470 475 480
 His Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala lieAlaSer Asn
 lieGly
 485 490 495
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 500 505 510
 Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
 Ser Asn
 515 520 525
 lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
 Pro Val
 530 535 540
 Leu Cys GinAspHis Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala
 lieAla
 545 550 555 560
 Asn Asn AsnGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
 LeuLeu
 565 570 575
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 580 585 590
 lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 595 600 605
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 610 615 620
 Val Ala lieAlaSer Asn lieGlyGly Lys GinAlaLeu Glu
 ThrVal
 625 630 635 640

Gin Arg	LeuLeuPro Val	LeuCysGin Asp	HisGlyLeu Thr
ProAsp			
	645	650	655
Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala			
Leu Glu			
	660	665	670
Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly			
Leu Thr			
	675	680	685
Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys			
Gin Ala			
	690	695	700
Leu Glu Ser lieVal Ala GinLeuSer Arg ArgAspPro Ala			
LeuAla			
705	710	715	720
Ala Leu ThrAsnAsp His LeuValAla Leu AlaCysLeu Gly			
GlyArg			
	725	730	735
Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Pro His Ala Pro			
Glu Phe			
	740	745	750
lie Arg Arg Val Asn Arg Arg lie Ala Glu Arg Thr Ser His			
Arg Val			
	755	760	765

Ala Asp Tyr Ala His Val Val Arg Val Leu Glu Phe Phe Gin
Cys His

770	775	780	
Ser His	Pro Ala His Ala Phe Asp Glu Ala Met Thr Gin Phe Gly Met		
785	790	795	800
Ser Arg His Gly Leu Val Gin Leu Phe Arg Arg Val Gly Val Thr Glu			
	805	810	815
Phe Glu Ala Arg Tyr Gly Thr Leu Pro Pro Ala Ser Gin Arg			
Trp Asp			
	820	825	830
Arg lie Leu Gin Ala Ser Gly Met Lys Arg Ala Lys Pro Ser			
Pro Thr			
	835	840	845
Ser Ala Gin Thr Pro Asp Gin Thr Ser Leu His Ala Phe Ala			
Asp Ser			
	850	855	860
Leu Glu Arg Asp Leu Asp Ala Pro Ser Pro Met His Glu Gly Asp Gin			
865	870	875	880
Thr Arg Ala Ser Ser Arg Lys Arg Ser Arg Ser Asp Arg Ala Val Thr			
	885	890	895
Gly Pro Ser Ala Gin Gin Ala Val Glu Val Arg Val Pro Glu			
Gin Arg			
	900	905	910
Asp Ala Leu His Leu Pro Leu Ser Trp Arg Val Lys Arg Pro			
Arg Thr			
	915	920	925
Arg lie Trp Gly Gly Leu Pro Asp Pro lie Ser Arg Ser Gin			
Leu Val			
	930	935	940
Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys			
945	950	955	960
Tyr Val Pro His Glu Tyr lie Glu Leu lie Glu lie Ala Arg Asn Ser			
	965	970	975
Thr Gin Asp Arg lie Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe			

Met Lys

980 985 990
Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys
Pro Asp

995 1000 1005
Gly Ala lie Tyr Thr Val Gly Ser Pro lie Asp Tyr Gly Val
lie Val

1010 1015 1020
Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro lie Gly
Gin Ala 1025 1030 1035 1040
Asp Glu Met Gin Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gin Thr Arg Asn
Lys His

1045 1050 1055
lie Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val
Thr Glu

1060 1065 1070
Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr
Lys Ala

1075 1080 1085
Gin Leu Thr Arg Leu Asn His lie Thr Asn Cys Asn Gly Ala
Val Leu

1090 1095 1100
Ser Val Glu GluLeu Leu lie Gly GlyGluMet lie Lys
AlaGly Thr

1105 1110 1115 1120
Leu Thr Leu GluGlu Val Arg Arg Lys PheAsn Asn Gly
Glulie Asn

1125 1130 1135
Phe

<210> 39

<211> 1137

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 39

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
Trp Lys Asp 15 10 15

Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
Pro Arg Arg 20 25 30

Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
 Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu
 50 55 60
 Asp Gly LeuProAlaArgArgThrValSerArgThrArgLeuPro Ser
 65 70 75 80
 Pro Pro AlaProSerProAlaPheSerAlaGlySerPheSerAsp Leu
 85 90 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
 Asp Ser
 100 105 110
 Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 Glu Trp
 115 120 125
 Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
 145 150 155 160
 Pro Arg ArgArgAlaAlaGinProSerAspAlaSerProAlaAla Gin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro
 210 215 220
 Ala Ala LeuGlyThrValAlaValThrTyrGinHislieliethr Ala
 225 230 235 240
 Leu Pro GluAlaThrHisGluAsplieValGlyValGlyLysGin Trp
 245 250 255

Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly
 Glu Leu
 260 265 270
 Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys
 lie Ala
 275 280 285
 Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
 Arg Asn
 290 295 300
 Ala Leu ThrGlyAlaProLeuAsnLeuThrProAlaGinValVal Ala
 305 310 315 320
 lie Ala SerHisAspGlyGlyLysGinAlaLeuGluThrValGin Arg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 340 345 350
 Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin Val ValAlaAlaAsnAsnAsnGlyGlyLysGinAlaLeu Glu
 385 390 395 400
 Thr Val GinArgLeuLeuProValLeuCysGinAspHisGlyLeu Thr
 405 410 415
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly Gly Lys
 Gin Ala
 420 425 430
 Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly
 435 440 445
 Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly
 Gly Lys
 450 455 460

Gin	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gin	Asp
465			470					475						480	
His	Gly	Leu	Thr	Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	Asn	Gly	Gly
		485						490						495	
Gly	Lys	Gin	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val		
Leu	Cys														
		500						505						510	
Gin	Asp	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala		
Asn	Asn														
		515						520						525	
Asn	Gly	Gly	Lys	Gin	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu		
Pro	Val														

530		535		540	
Leu Cys	GinAspHis Gly	LeuThrPro Asp	GinValVal	Ala	
	lieAla				
545		550		555	560
Ser His	AspGlyGly Lys	GinAlaLeu Glu	ThrValGin	Arg	
	LeuLeu				
	565	570		575	
Pro Val	Leu Cys Gin Asp His Gly	Leu Thr	Pro Asp	Gin Val	
Val Ala					
	580	585		590	
lie Ala	Ser Asn Gly Gly Gly Lys	Gin Ala	Leu Glu	Thr Val	
Gin Arg					
	595	600		605	
Leu Leu	Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly	Leu Thr	Pro Asp		
Gin Val					
	610	615		620	
Val Ala	lieAlaSer His	AspGlyGly Lys	GinAlaLeu	Glu	
	ThrVal				
625		630		635	640
Gin Arg	LeuLeuPro Val	LeuCysGin Asp	HisGlyLeu	Thr	
	ProAsp				
	645	650		655	
Gin Val	Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly	Gly Lys	Gin Ala		
Leu Glu					
	660	665		670	
Thr Val	Gin Arg Leu Leu Pro Val	Leu Cys	Gin Asp	His Gly	
Leu Thr					
	675	680		685	
Pro Asp	Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly	Gly Gly	Lys		
Gin Ala					
	690	695		700	
Leu Glu	SerlieVal Ala	GinLeuSer Arg	ArgAspPro	Ala	
	LeuAla				
705		710		715	720
Ala Leu	ThrAsnAsp His	LeuValAla	Leu	AlaCysLeu	Gly

GlyArg
 725 730 735
 Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Pro His Ala Pro
 Glu Phe
 740 745 750
 lie Arg Arg Val Asn Arg Arg lie Ala Glu Arg Thr Ser His
 Arg Val
 755 760 765
 Ala Asp Tyr Ala His Val Val Arg Val Leu Glu Phe Phe Gin
 Cys His
 770 775 780
 Ser His ProAlaHis Ala PheAspGlu Ala MetThrGin Phe
 GlyMet
 785 790 795 800
 Ser Arg HisGlyLeu Val GinLeuPhe Arg ArgValGly Val
 ThrGlu
 805 810 815
 Phe Glu Ala Arg Tyr Gly Thr Leu Pro Pro Ala Ser Gin Arg
 Trp Asp
 820 825 830
 Arg lie Leu Gin Ala Ser Gly Met Lys Arg Ala Lys Pro Ser
 Pro Thr
 835 840 845
 Ser Ala Gin Thr Pro Asp Gin Thr Ser Leu His Ala Phe Ala
 Asp Ser
 850 855 860
 Leu Glu ArgAspLeu Asp AlaProSer Pro MetHisGlu Gly
 AspGin
 865 870 875 880
 Thr Arg AlaSerSer Arg LysArgSer Arg SerAspArg Ala
 ValThr
 885 890 895
 Gly Pro Ser Ala Gin Gin Ala Val Glu Val Arg Val Pro Glu
 Gin Arg
 900 905 910

Asp Ala Leu His Leu Pro Leu Ser Trp Arg Val Lys Arg Pro
Arg Thr

915

920

925

Arg lie Trp Gly Gly Leu Pro Asp Pro lie Ser Arg Ser Gin
Leu Val

930

935

940

Lys Ser GluLeuGlu Glu LysLysSer Glu LeuArgHis Lys
LeuLys

945

950

955

960

Tyr Val ProHisGlu Tyr lieGluLeu lie GlulieAla Arg
AsnSer

965

970

975

Thr Gin Asp Arg lie Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe
Met Lys

980

985

990

Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys
Pro Asp

995

1000

1005

Gly Ala lie Tyr Thr Val Gly Ser Pro lie Asp Tyr Gly Val
lie Val

1010

1015

1020

Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro lie Gly
Gin Ala 1025 1030 1035 1040

Asp Glu Met Gin Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gin Thr Arg
 Asn Lys His 10451050 1055
 lie Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser
 Val Thr Glu 10601065 1070
 Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn
 Tyr Lys Ala 10751080 1085
 Gin Leu Thr Arg Leu Asn His lie Thr Asn Cys Asn Gly Ala
 Val Leu 1090 1095 1100
 Ser Val Glu GluLeu Leu lie Gly GlyGluMet lie Lys
 AlaGly Thr
 1105 1110 1115 1120
 Leu Thr Leu GluGlu Val Arg Arg Lys PheAsn Asn Gly
 Glulie Asn
 1125 1130 1135
 Phe

<210> 40

<211> 1137

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 40

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
Trp Lys Asp 15 10 15
Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
Pro Arg Arg 20 25 30
Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
Arg Val 35 40 45
Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
Pro Leu
50 55 60
Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeuProSer
65 70 75 80
Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSerAspLeu
85 90 95
Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
Asp Ser
100 105 110
Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
Glu Trp
115 120 125
Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
Pro Thr
130 135 140
Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
145 150 155 160
Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAlaAlaGin
165 170 175
Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
Lys lie
180 185 190
Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
Leu Val
195 200 205
Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
His Pro
210 215 220

Ala AlaLeu Gly Thr Val Ala Val Thr TyrGin His lie lie ThrAla
 225 230 235 240
 Leu ProGluAla Thr His Glu Asp lie ValGly Val Gly Lys GinTrp
 245 250 255
 Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly
 Glu Leu
 260 265 270
 Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys
 lie Ala
 275 280 285
 Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
 Arg Asn
 290 295 300

Ala	Leu	Thr	Gly	Ala	Pro	Leu	Asn	Leu	Thr	Pro	Ala	Gin	Val
	Val	Ala											
305				310				315				320	
lie	Ala	Ser	Asn	lie	Gly	Gly	Lys	Gin	Ala	Leu	Glu	Thr	Val
	Gin	Arg											
			325				330				335		
Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gin	Asp	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Asp
Gin	Val												
			340				345				350		
Val	Ala	lie	Ala	Asn	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys	Gin	Ala	Leu	Glu
Thr	Val												
			355			360				365			
Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gin	Asp	His	Gly	Leu	Thr
Pro	Asp												
			370			375				380			
Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	Asn	lie	Gly	Gly	Lys	Gin	Ala
	Leu	Glu											
385				390				395				400	
Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gin	Asp	His	Gly
	Leu	Thr											
				405				410				415	
Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys
Gin	Ala												
				420				425				430	
Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gin	Asp
His	Gly												
				435				440				445	
Leu	Thr	Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	Asn	lie	Gly
Gly	Lys												
				450				455				460	
Gin	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys
	Gin	Asp											
465					470				475				480
His	Gly	Leu	Thr	Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	Asn

lieGly
 485 490 495
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 500 505 510
 Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
 Ser Asn
 515 520 525
 lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
 Pro Val
 530 535 540
 Leu Cys GinAspHis Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala
 lieAla
 545 550 555 560
 Ser His AspGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
 LeuLeu
 565 570 575
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 580 585 590
 lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 595 600 605
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 610 615 620
 Val Ala lieAlaSer Asn lieGlyGly Lys GinAlaLeu Glu
 ThrVal
 625 630 635 640
 Gin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Asp HisGlyLeu Thr
 ProAsp
 645 650 655
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala
 Leu Glu
 660 665 670

Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly
 Leu Thr
 675 680 685
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys
 Gin Ala
 690 695 700
 Leu Glu SerlieVal Ala GinLeuSer Arg ArgAspPro Ala
 LeuAla
 705 710 715 720
 Ala Leu ThrAsnAsp His LeuValAla Leu AlaCysLeu Gly
 GlyArg
 725 730 735
 Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Pro His Ala Pro
 Glu Phe
 740 745 750
 lie Arg Arg Val Asn Arg Arg lie Ala Glu Arg Thr Ser His
 Arg Val
 755 760 765
 Ala Asp Tyr Ala His Val Val Arg Val Leu Glu Phe Phe Gin
 Cys His
 770 775 780
 Ser His ProAlaHis Ala PheAspGlu Ala MetThrGin Phe
 GlyMet
 785 790 795 800
 Ser Arg HisGlyLeu Val GinLeuPhe Arg ArgValGly Val
 ThrGlu

	805	810	815
Phe	Glu	Ala	Arg
Tyr	Gly	Thr	Leu
Pro	Pro	Ala	Ser
Gln	Arg	Trp	Asp
	820	825	830
Arg	lie	Leu	Gln
Ala	Ser	Gly	Met
Lys	Arg	Ala	Lys
Pro	Ser	Pro	Thr
	835	840	845
Ser	Ala	Gln	Thr
Pro	Asp	Gln	Thr
Ser	Leu	His	Ala
Phe	Ala	Asp	Ser
	850	855	860
Leu	Glu	Arg	Asp
Leu	Asp	Ala	Pro
Ser	Pro	Met	His
Glu	Gly	Asp	Gln
	865	870	875
Thr	Arg	Ala	Ser
Ser	Arg	Lys	Arg
Ser	Arg	Ser	Asp
Arg	Ala	Val	Thr
	885	890	895
Gly	Pro	Ser	Ala
Gln	Gln	Ala	Val
Glu	Val	Arg	Val
Pro	Glu	Gln	Arg
	900	905	910
Asp	Ala	Leu	His
Leu	Pro	Leu	Ser
Trp	Arg	Val	Lys
Arg	Pro	Arg	Thr
	915	920	925
Arg	lie	Trp	Gly
Gly	Leu	Pro	Asp
Pro	lie	Ser	Arg
Ser	Gln	Leu	Val
	930	935	940
Lys	Ser	Glu	Leu
Glu	Glu	Lys	Lys
Ser	Glu	Leu	Arg
His	Lys	Leu	Lys
	945	950	955
Tyr	Val	Pro	His
Glu	Tyr	lie	Glu
Leu	lie	Glu	lie
Ala	Arg	Asn	Ser
	965	970	975
Thr	Gln	Asp	Arg
lie	Leu	Glu	Met
Lys	Val	Met	Glu
Phe	Phe	Met	Lys
	980	985	990
Val	Tyr	Gly	Tyr
Arg	Gly	Lys	His
Leu	Gly	Gly	Ser
Arg	Lys	Pro	Asp
	995	1000	1005
Gly	Ala	lie	Tyr
Thr	Val	Gly	Ser
Pro	lie	Asp	Tyr
Gly	Val	lie	Val

1010	1015	1020	
Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro	lie Gly		
Gin Ala 1025	1030	1035	1040
Asp Glu Met Gin Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gin Thr Arg Asn			
Lys His			
	1045	1050	1055
lie Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val			
Thr Glu			
	1060	1065	1070
Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr			
Lys Ala			
	1075	1080	1085
Gin Leu Thr Arg Leu Asn His lie Thr Asn Cys Asn Gly Ala			
Val Leu			
	1090	1095	1100
Ser Val Glu Glu Leu Leu lie Gly Gly Glu Met lie Lys			
Ala Gly Thr			
1105	1110	1115	1120
Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly			
Glulie Asn			
	1125	1130	1135
Phe			

<210> 41

<211> 1137

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 41

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
 Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
 Pro Arg Arg 20 25 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro
 Asp Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu 50 55 60
 Asp Gly Leu Pro Ala Arg Arg Thr Val Ser Arg Thr Arg Leu
 Pro Ser

65	70	75	80
Pro	Pro	Ala	Pro
Asp	Leu	Ser	Ala
Pro	Ala	Phe	Ser
Pro	Ala	Gly	Ser
Phe	Ser		
85	90	95	
Leu	Arg	Pro	Phe
Asp	Pro	Ser	Leu
Leu	Leu	Asp	Thr
Ser	Leu	Leu	
100	105	110	
Met	Pro	Ala	Val
Gly	Thr	Pro	His
Thr	Ala	Ala	Ala
Pro	Ala		
Glu	Trp		
115	120	125	
Asp	Glu	Ala	Gin
Ser	Ala	Leu	Arg
Ala	Ala	Asp	Asp
Pro	Pro		
Pro	Thr		
130	135	140	
Val	Arg	Val	Ala
Val	Thr	Ala	Ala
Arg	Pro	Pro	Arg
Ala	Lys	Pro	Ala
145	150	155	160
Pro	Arg	Arg	Arg
Ala	Ala	Gin	Pro
Ser	Asp	Ala	Ser
Pro	Ala	Ala	Gin
165	170	175	
Val	Asp	Leu	Arg
Thr	Leu	Gly	Tyr
Ser	Gin	Gin	Gin
Gin	Gin	Glu	
Lys	lie		
180	185	190	
Lys	Pro	Lys	Val
Arg	Ser	Thr	Val
Ala	Gin	His	His
Glu	Ala		
Leu	Val		
195	200	205	
Gly	His	Gly	Phe
Thr	His	Ala	His
lie	Val	Ala	Leu
Ser	Gin		
His	Pro		
210	215	220	
Ala	Ala	Leu	Gly
Thr	Val	Ala	Val
Thr	Tyr	Gin	His
lie	lie	Thr	Ala
225	230	235	240
Leu	Pro	Glu	Ala
Thr	His	Glu	Asp
lie	Val	Gly	Val
Gly	Lys	Gin	Trp
245	250	255	
Ser	Gly	Ala	Arg
Ala	Leu	Glu	Ala
Leu	Leu	Thr	Asp
Ala	Gly		
Glu	Leu		
260	265	270	
Arg	Gly	Pro	Pro
Leu	Gin	Leu	Asp
Thr	Gly	Gin	Leu
Val	Lys		
lie	Ala		

275	280	285	
Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser			
Arg Asn			
290	295	300	
Ala Leu Thr Gly Ala Pro Leu Asn Leu Thr Pro Ala Gin Val Val Ala			
305	310	315	320
lie Ala Asn Asn Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg			
325	330	335	
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp			
Gin Val			
340	345	350	
Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu			
Thr Val			
355	360	365	
Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr			
Pro Asp			
370	375	380	
Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu			
385	390	395	400
Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr			
405	410	415	
Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys			
Gin Ala			
420	425	430	
Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp			
His Gly			
435	440	445	
Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly			
Gly Lys			
450	455	460	
Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp			
465	470	475	480
His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly			
485	490	495	
Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val			

Leu Cys
 500 505 510
 Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
 Asn Asn
 515 520 525
 Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
 Pro Val
 530 535 540
 Leu Cys GinAspHisGlyLeuThrProAspGinValValAlalie Ala
 545 550 555 560
 Ser His AspGlyGlyLysGinAlaLeuGluThrValGinArgLeu Leu
 565 570 575

Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val Val Ala 580 585
 590
 lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg 595 600 605
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 610 615 620
 Val Ala lieAlaSer Asn lieGlyGly Lys GinAlaLeu Glu
 ThrVal
 625 630 635 640
 Gin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Asp HisGlyLeu Thr
 ProAsp
 645 650 655
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala
 Leu Glu
 660 665 670
 Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly
 Leu Thr
 675 680 685
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 Gin Ala
 690 695 700
 Leu Glu SerlieVal Ala GinLeuSer Arg ArgAspPro Ala
 LeuAla
 705 710 715 720
 Ala Leu ThrAsnAsp His LeuValAla Leu AlaCysLeu Gly
 GlyArg
 725 730 735
 Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Pro His Ala Pro
 Glu Phe
 740 745 750
 lie Arg Arg Val Asn Arg Arg lie Ala Glu Arg Thr Ser His
 Arg Val
 755 760 765

241

945	950	955	960
Tyr Val	ProHisGlu Tyr	lieGluLeu lie	GlulieAla Arg
	AsnSer		
	965	970	975
Thr Gin Asp Arg	lie Leu Glu Met Lys Val	Met Glu Phe Phe	
Met Lys			
	980	985	990
Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys			
Pro Asp			
	995	1000	1005
Gly Ala lie Tyr Thr Val Gly Ser Pro lie Asp Tyr Gly Val			
lie Val			
	1010	1015	1020
Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro lie Gly			
Gin Ala 1025	1030	1035	1040
Asp Glu Met Gin Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gin Thr Arg Asn			
Lys His			
	1045	1050	1055
lie Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val			
Thr Glu			
	1060	1065	1070
Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr			
Lys Ala			

1075	1080	1085
Gin Leu Thr Arg Leu Asn His lie Thr Asn Cys Asn Gly Ala		
Val Leu		
1090	1095	1100
Ser Val Glu GluLeu Leu lie Gly GlyGluMet lie Lys		
AlaGly Thr		
1105	1110	1115
Leu Thr Leu GluGlu Val Arg Arg Lys PheAsn Asn Gly		
Glu lie Asn		
1125	1130	1135
Phe		

<210> 42

<211> 1171

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 42

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
Trp Lys Asp 15 10 15
Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
Pro Arg Arg 20 25 30
Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
Arg Val 35 40 45
Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
Pro Leu
50 55 60
Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeu ProSer
65 70 75 80
Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSer AspLeu
85 90 95
Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
Asp Ser
100 105 110
Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
Glu Trp
115 120 125
Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
Pro Thr
130 135 140
Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLys ProAla
145 150 155 160
Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAla AlaGin
165 170 175
Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
Lys lie
180 185 190
Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
Leu Val
195 200 205
Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
His Pro
210 215 220

Ala AlaLeu Gly Thr Val Ala Val Thr TyrGin His lie lie ThrAla
 225 230 235 240
 Leu ProGluAla Thr His Glu Asp lie ValGly Val Gly Lys GinTrp
 245 250 255
 Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly
 Glu Leu
 260 265 270
 Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys
 lie Ala
 275 280 285
 Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
 Arg Asn
 290 295 300
 Ala LeuThr GlyAla ProLeu AsnLeu ThrPro Ala Gin ValValAla
 305 310 315 320
 lie AlaSer Asn lie Gly Gly Lys Gin AlaLeu Glu Thr ValGinArg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val

340	345	350	
Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu			
Thr Val			
355	360	365	
Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr			
Pro Asp			
370	375	380	
Gin Val ValAlalie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala			
LeuGlu			
385	390	395	400
Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly			
LeuThr			
405	410	415	
Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys			
Gin Ala			
420	425	430	
Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp			
His Gly			
435	440	445	
Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly			
Gly Lys			
450	455	460	
Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys			
GinAsp			
465	470	475	480
His Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala lieAlaSer Asn			
GlyGly			
485	490	495	
Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val			
Leu Cys			
500	505	510	
Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala			
Ser His			
515	520	525	
Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu			

Pro Val
 530 535 540
 Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala
 lie Ala
 545 550 555 560
 Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg
 Leu Leu
 565 570 575
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 580 585 590
 lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 595 600 605
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 610 615 620
 Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 625 630 635 640
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 645 650 655
 Gin Val Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly Gly Lys Gin Ala
 Leu Glu
 660 665 670
 Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly
 Leu Thr
 675 680 685
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 Gin Ala
 690 695 700
 Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly
 705 710 715 720

Leu Thr	ProAspGin Val	ValAlaliele Ala	SerAsnGly Gly
	GlyLys		
	725	730	735
Gin Ala Leu Glu Ser lie Val Ala Gin Leu Ser Arg Arg Asp			
Pro Ala			
	740	745	750
Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys			
Leu Gly			
	755	760	765
Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Pro His			
Ala Pro			
	770	775	780
Glu Phe lieArgArg Val AsnArgArg lie AlaGluArg Thr			
SerHis			
785	790	795	800
Arg Val AlaAspTyr Ala HisValVal Arg ValLeuGlu Phe			
PheGin			
	805	810	815
Cys His Ser His Pro Ala His Ala Phe Asp Glu Ala Met Thr			
Gin Phe			
	820	825	830
Gly Met Ser Arg His Gly Leu Val Gin Leu Phe Arg Arg Val			
Gly Val			
	835	840	845

Thr Glu Phe Glu Ala Arg Tyr Gly Thr Leu Pro Pro Ala Ser
Gin Arg

850	855	860	
Trp	AspArg	lie	LeuGinAlaSerGlyMetLysArgAlaLysProSer
865	870	875	880
Pro	ThrSerAlaGinThrProAspGinThrSerLeuHisAlaPheAla		
	885	890	895
Asp	SerLeuGluArgAspLeuAspAlaProSerProMetHis		
Glu	Gly		
	900	905	910
Asp	GinThrArgAlaSerSerArgLysArgSerArgSerAsp		
Arg	Ala		
	915	920	925
Val	ThrGlyProSerAlaGinGinAlaValGluValArgVal		
Pro	Glu		
	930	935	940
Gin	ArgAspAlaLeuHisLeuProLeuSerTrpArgValLysArgPro		
945	950	955	960
Arg	ThrArglieTrpGlyGlyLeuProAspProlieSerArgSerGin		
	965	970	975
Leu	ValLysSerGluLeuGluGluLysLysSerGluLeuArg		
His	Lys		
	980	985	990
Leu	LysTyrValProHisGluTyrlieGluLeulieGlu		
Ala	Arg		
	995	1000	1005
Asn	SerThrGinAspArglieLeuGluMetLysValMetGlu		
Phe	Phe		
	1010	1015	1020
Met	LysValTyrGlyTyrArgGlyLysHisLeuGlyGlySer		
Arg	Lys	1025	1030
		1035	1040
Pro	AspGlyAla	lie	TyrThrValGlySerProlieAspTyr
Gly	Val		
	1045	1050	1055

lie Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro
lie Gly

1060 1065 1070
Gin Ala Asp Glu Met Gin Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gin Thr
Arg Asn

1075 1080 1085
Lys His lie Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser
Ser Val

1090 1095 1100
Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys
Gly Asn Tyr

1105 1110 1115 1120
Lys Ala Gin Leu Thr Arg Leu Asn His lie Thr Asn Cys
Asn Gly Ala

1125 1130 1135
Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu lie Gly Gly Glu Met lie
Lys Ala

1140 1145 1150
Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn
Gly Glu

1155 1160 1165
lie Asn Phe

1170

<210> 43

<211> 1239

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 43

Met	Ala	Ser	Ser	Pro	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Ser
Trp	Lys	Asp	15				10				15	
Ala	Ser	Gly	Trp	Ser	Arg	Met	His	Ala	Asp	Pro	lie	Arg
				Pro	Arg	Arg	20	25			30	
Pro	Ser	Pro	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Gly	Pro	Gin	Pro
		Asp	Arg	Val	35	40				45		
Gin	Pro	Thr	Ala	Asp	Arg	Gly	Val	Ser	Ala	Pro	Ala	Gly
		Ser	Pro	Leu	50	55				60		
Asp	Gly	Leu	Pro	Ala	Arg	Arg	Thr	Val	Ser	Arg	Thr	Arg
Leu	Pro	Ser	65	70				75			80	

Pro Pro Ala Pro Ser Pro Ala Phe Ser Ala Gly Ser
 Phe Ser Asp Leu 85 90
 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser
 Leu Leu Asp Ser 100 105
 110
 Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 Glu Trp 115 120 125
 Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Val ArgValAlaValThr Ala AlaArgPro Pro ArgAlaLys Pro
 Ala
 145 150 155 160
 Pro Arg ArgArgAla Ala GinProSer Asp AlaSerPro Ala
 AlaGin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro
 210 215 220
 Ala Ala LeuGlyThr Val AlaValThr Tyr GinHislie lie
 ThrAla
 225 230 235 240
 Leu Pro GluAlaThr His GluAsplie Val GlyValGly Lys
 GinTrp
 245 250 255
 Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly
 Glu Leu
 260 265 270

Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys
 lie Ala
 275 280 285
 Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
 Arg Asn
 290 295 300
 Ala Leu ThrGlyAla Pro LeuAsnLeu Thr ProAlaGin Val
 ValAla
 305 310 315 320
 lie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val
 GinArg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 340 345 350
 Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin Val ValAlaAlie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala
 LeuGlu
 385 390 395 400
 Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly
 LeuThr
 405 410 415
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys
 Gin Ala
 420 425 430
 Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly
 435 440 445
 Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly
 Gly Lys

450		455		460	
Gin Ala	LeuGluThr Val	GinArgLeu Leu	ProValLeu	Cys	
	GinAsp				
465		470		475	480
His Gly	LeuThrPro Asp	GinValVal Ala	lieAlaSer	Asn	
	lieGly				
	485	490		495	
Gly Lys	Gin Ala Leu Glu Thr Val	Gin Arg Leu Leu Pro Val			
Leu Cys					
	500	505		510	
Gin Asp	His Gly Leu Thr Pro Asp	Gin Val Val Ala lie Ala			
Ser Asn					
	515	520		525	
lie Gly	Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val	Gin Arg Leu Leu			
Pro Val					
	530	535		540	
Leu Cys	GinAspHis Gly	LeuThrPro Asp	GinValVal	Ala	
	lieAla				
545		550		555	560
Asn Asn	AsnGlyGly Lys	GinAlaLeu Glu	ThrValGin	Arg	
	LeuLeu				
	565	570		575	
Pro Val	Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr	Pro Asp Gin Val			
Val Ala					

580	585	590	
lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val			
Gin Arg			
595	600	605	
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp			
Gin Val			
610	615	620	
Val Ala lieAlaSerAsnlieGlyGlyLysGinAlaLeuGluThr Val			
625	630	635	640
Gin Arg LeuLeuProValLeuCysGinAspHisGlyLeuThrPro Asp			
645	650	655	
Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala			
Leu Glu			
660	665	670	
Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly			
Leu Thr			
675	680	685	
Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys			
Gin Ala			
690	695	700	
Leu Glu ThrValGinArgLeuLeuProValLeuCysGinAspHis Gly			
705	710	715	720
Leu Thr ProAspGinValValAlalieAlaSerHisAspGlyGly Lys			
725	730	735	
Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys			
Gin Asp			
740	745	750	
His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn			
lie Gly			
755	760	765	
Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val			
Leu Cys			
770	775	780	
Gin Asp HisGlyLeuThrProAspGinValValAlalieAlaSer Asn			
785	790	795	800

Gly Gly	GlyLysGinAlaLeuGluSerlieValAlaGinLeuSer	Arg
	805	810 815
Arg Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val		
Ala Leu	820	825 830
Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys		
Gly Leu	835	840 845
Pro His Ala Pro Glu Phe lie Arg Arg Val Asn Arg Arg lie		
Ala Glu	850	855 860
Arg Thr	SerHisArgValAlaAspTyrAlaHisValValArgVal	Leu
865	870	875 880
Glu Phe	PheGinCysHisSerHisProAlaHisAlaPheAspGlu	Ala
	885	890 895
Met Thr Gin Phe Gly Met Ser Arg His Gly Leu Val Gin Leu		
Phe Arg	900	905 910
Arg Val Gly Val Thr Glu Phe Glu Ala Arg Tyr Gly Thr Leu		
Pro Pro	915	920 925
Ala Ser Gin Arg Trp Asp Arg lie Leu Gin Ala Ser Gly Met		
Lys Arg	930	935 940
Ala Lys	ProSerProThrSerAlaGinThrProAspGinThrSer	Leu
945	950	955 960
His Ala	PheAlaAspSerLeuGluArgAspLeuAspAlaProSer	Pro
	965	970 975
Met His Glu Gly Asp Gin Thr Arg Ala Ser Ser Arg Lys Arg		
Ser Arg	980	985 990
Ser Asp Arg Ala Val Thr Gly Pro Ser Ala Gin Gin Ala Val		
Glu Val	995	1000 1005
Arg Val Pro Glu Gin Arg Asp Ala Leu His Leu Pro Leu Ser		

Trp Arg
 1010 1015 1020
 Val Lys Arg ProArg Thr Arg lie TrpGlyGly Leu Pro
 AspPro lie
 1025 1030 1035 1040
 Ser Arg Ser GinLeu Val Lys Ser GluLeuGlu Glu Lys
 LysSer Glu
 1045 1050 1055
 Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr lie Glu
 Leu lie
 1060 1065 1070
 Glu lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin Asp Arg lie Leu Glu Met
 Lys Val
 1075 1080 1085

Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His
Leu Gly

1090		1095		1100
Gly Ser Arg	Lys Pro	Asp Gly	Ala	lie Tyr Thr Val Gly
	Ser Pro lie			
1105		1110		1115
Asp Tyr Gly	Vallie	Val Asp	Thr	Lys Ala Tyr Ser Gly
	Gly Tyr Asn			
	1125		1130	1135
Leu Pro lie Gly Gin Ala Asp Glu Met Gin Arg Tyr Val Glu				
Glu Asn				
	1140		1145	1150
Gin Thr Arg Asn Lys His lie Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys				
Val Tyr				
	1155		1160	1165
Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly				
His Phe				
	1170		1175	1180
Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu Thr Arg Leu Asn His lie				
Thr Asn 1185	1190		1195	1200
Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu lie Gly				
Gly Glu				
	1205		1210	1215
Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg				
Lys Phe				
	1220		1225	1230
Asn Asn Gly Glu lie Asn Phe				
	1235			

<210> 44

<211> 1239

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 44

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
Trp Lys Asp 15 10 15
Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
Pro Arg Arg 20 25 30
Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
Arg Val 35 40 45
Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
Pro Leu
50 55 60
Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeuProSer
65 70 75 80
Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSerAspLeu
85 90 95
Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
Asp Ser
100 105 110
Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
Glu Trp
115 120 125
Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
Pro Thr
130 135 140
Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
145 150 155 160
Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAlaAlaGin
165 170 175
Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
Lys lie
180 185 190
Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
Leu Val
195 200 205
Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
His Pro
210 215 220

Ala	Ala	Leu	Gly	Thr	Val	Ala	Val	Thr	Tyr	Gln	His	Leu	Leu	Thr	Ala
225					230					235					240
Leu	Pro	Glu	Ala	Thr	His	Glu	Asp	Leu	Val	Gly	Val	Gly	Lys	Gln	Trp
				245					250					255	

Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp
 Ala Gly Glu Leu 260 265
 270
 Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys
 lie Ala 275 280 285
 Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
 Arg Asn
 290 295 300
 Ala Leu ThrGlyAla Pro LeuAsnLeu Thr ProAlaGin Val
 ValAla
 305 310 315 320
 lie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val
 GinArg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 340 345 350
 Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin Val ValAlalie Ala AsnAsnAsn Gly GlyLysGin Ala
 LeuGlu
 385 390 395 400
 Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly
 LeuThr
 405 410 415
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly Gly Lys
 Gin Ala
 420 425 430
 Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly
 435 440 445

Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly
 Gly Lys
 450 455 460
 Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys
 GinAsp
 465 470 475 480
 His Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala lieAlaSer Asn
 GlyGly
 485 490 495
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 500 505 510
 Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
 Asn Asn
 515 520 525
 Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
 Pro Val
 530 535 540
 Leu Cys GinAspHis Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala
 lieAla
 545 550 555 560
 Ser His AspGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
 LeuLeu
 565 570 575
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 580 585 590
 lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 595 600 605
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 610 615 620
 Val Ala lieAlaSer His AspGlyGly Lys GinAlaLeu Glu
 ThrVal

625		630		635		640
Gin Arg	LeuLeuPro Val	LeuCysGin Asp	HisGlyLeu	Thr		
	ProAsp					
	645	650	655			
Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala						
Leu Glu						
	660	665	670			
Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly						
Leu Thr						
	675	680	685			
Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys						
Gin Ala						
	690	695	700			
Leu Glu ThrValGin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Asp						
	HisGly					
705	710	715	720			
Leu Thr ProAspGin Val ValAlalie Ala SerHisAsp Gly						
	GlyLys					
	725	730	735			
Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys						
Gin Asp						
	740	745	750			
His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn						
Gly Gly						

755	760	765	
Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val	Gin Arg Leu Leu Pro Val		
Leu Cys			
770	775	780	
Gin AspHisGlyLeuThrProAspGinValValAla	lieAlaSerAsn		
785	790	795	800
Gly GlyGlyLysGinAlaLeuGluSer	lieValAlaGinLeuSerArg		
	805	810	815
Arg Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val			
Ala Leu			
	820	825	830
Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys			
Gly Leu			
	835	840	845
Pro His Ala Pro Glu Phe	lie Arg Arg Val Asn Arg Arg	lie	
Ala Glu			
	850	855	860
Arg ThrSerHisArgValAlaAspTyrAlaHisValValArgValLeu			
865	870	875	880
Glu PhePheGinCysHisSerHisProAlaHisAlaPheAspGluAla			
	885	890	895
Met Thr Gin Phe Gly Met Ser Arg His Gly Leu Val Gin Leu			
Phe Arg			
	900	905	910
Arg Val Gly Val Thr Glu Phe Glu Ala Arg Tyr Gly Thr Leu			
Pro Pro			
	915	920	925
Ala Ser Gin Arg Trp Asp Arg	lie Leu Gin Ala Ser Gly Met		
Lys Arg			
	930	935	940
Ala LysProSerProThrSerAlaGinThrProAspGinThrSerLeu			
945	950	955	960
His AlaPheAlaAspSerLeuGluArgAspLeuAspAlaProSerPro			
	965	970	975
Met His Glu Gly Asp Gin Thr Arg Ala Ser Ser Arg Lys Arg			

Ser Arg
 980 985 990
 Ser Asp Arg Ala Val Thr Gly Pro Ser Ala Gin Gin Ala Val
 Glu Val
 995 1000 1005
 Arg Val Pro Glu Gin Arg Asp Ala Leu His Leu Pro Leu Ser
 Trp Arg
 1010 1015 1020
 Val Lys Arg ProArg Thr Arg lie TrpGlyGly Leu Pro
 AspPro lie
 1025 1030 1035 1040
 Ser Arg Ser GinLeu Val Lys Ser GluLeuGlu Glu Lys
 LysSer Glu
 1045 1050 1055
 Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr lie Glu
 Leu lie
 1060 1065 1070
 Glu lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin Asp Arg lie Leu Glu Met
 Lys Val
 1075 1080 1085
 Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His
 Leu Gly
 1090 1095 1100
 Gly Ser Arg LysPro Asp Gly Ala lieTyrThr Val Gly
 SerPro lie
 1105 1110 1115 1120
 Asp Tyr Gly Vallie Val Asp Thr LysAlaTyr Ser Gly
 GlyTyr Asn
 1125 1130 1135
 Leu Pro lie Gly Gin Ala Asp Glu Met Gin Arg Tyr Val Glu
 Glu Asn
 1140 1145 1150
 Gin Thr Arg Asn Lys His lie Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys
 Val Tyr
 1155 1160 1165

Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly
His Phe

1170 1175 1180

Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu Thr Arg Leu Asn His lie

Thr Asn 1185 1190 1195 1200

Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu lie Gly
Gly Glu

1205 1210 1215

Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg
Lys Phe

1220 1225 1230

Asn Asn Gly Glu lie Asn Phe

1235

<210> 45

<211> 1239

<212> PRT

<213> Yapay

Dizi <220>

<223> sentetik

<400> 45

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
 Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
 Pro Arg Arg 20 25 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
 Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu
 50 55 60
 Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeuProSer
 65 70 75 80
 Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSerAspLeu
 85 90 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
 Asp Ser
 100 105 110
 Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 Glu Trp
 115 120 125
 Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
 145 150 155 160
 Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAlaAlaGin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro
 210 215 220

Ala AlaLeu Gly Thr Val Ala Val Thr TyrGin His lie lie ThrAla
 225 230 235 240
 Leu ProGlu Ala Thr His Glu Asp lie ValGly Val Gly Lys GinTrp
 245 250 255
 Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly
 Glu Leu
 260 265 270
 Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys
 lie Ala
 275 280 285
 Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
 Arg Asn
 290 295 300
 Ala LeuThr Gly Ala Pro Leu Asn Leu ThrPro Ala Gin Val ValAla
 305 310 315 320
 lie AlaSer Asn lie Gly Gly Lys Gin AlaLeu Glu Thr Val GinArg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 340 345 350
 Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin ValVal Ala lie Ala Ser Asn lie GlyGly Lys Gin Ala LeuGlu
 385 390 395 400
 Thr ValGin Arg Leu Leu Pro Val Leu CysGin Asp His Gly LeuThr
 405 410 415
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 Gin Ala
 420 425 430

Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly 435 440 445
 Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly
 Gly Lys
 450 455 460
 Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys
 GinAsp
 465 470 475 480
 His Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala lieAlaSer Asn
 lieGly
 485 490 495
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 500 505 510
 Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
 Ser Asn
 515 520 525
 lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
 Pro Val
 530 535 540
 Leu Cys GinAspHis Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala
 lieAla
 545 550 555 560
 Ser His AspGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
 LeuLeu
 565 570 575
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 580 585 590
 lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 595 600 605
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 610 615 620

Val	Ala	lie	Ala	Ser	Asn	lie	Gly	Gly	Lys	Gin	Ala	Leu	Glu
	Thr	Val											
625				630				635				640	
Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gin	Asp	His	Gly	Leu	Thr
	Pro	Asp											
			645				650					655	
Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys	Gin	Ala
Leu	Glu												
			660				665					670	
Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gin	Asp	His	Gly
Leu	Thr												
			675				680					685	
Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	Asn	lie	Gly	Gly	Lys
Gin	Ala												
	690				695				700				
Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gin	Asp
		His	Gly										
705					710				715			720	
Leu	Thr	Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	Asn	lie	Gly
		Gly	Lys										
				725				730				735	
Gin	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys
Gin	Asp												
				740				745				750	
His	Gly	Leu	Thr	Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	His
Asp	Gly												
				755				760				765	
Gly	Lys	Gin	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val
Leu	Cys												
	770							775				780	
Gin	Asp	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala
		Ser	Asn										
785					790				795			800	
Gly	Gly	Gly	Lys	Gin	Ala	Leu	Glu	Ser	lie	Val	Ala	Gin	Leu
		Ser	Arg										

	805		810		815	
Arg	Asp	Pro	Ala	Leu	Ala	Ala
Leu	Thr	Asn	Asp	His	Leu	Val
Ala	Leu					
	820		825		830	
Ala	Cys	Leu	Gly	Gly	Arg	Pro
Ala	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	Lys
Gly	Leu					
	835		840		845	
Pro	His	Ala	Pro	Glu	Phe	lie
Arg	Arg	Val	Asn	Arg	Arg	lie
Ala	Glu					
	850		855		860	
Arg	Thr	Ser	His	Arg	Val	Ala
Ala	Asp	Tyr	Ala	His	Val	Val
Val	Leu					Arg
	865		870		875	
Glu	Phe	Phe	Gin	Cys	His	Ser
His	Pro	Ala	His	Ala	Phe	Asp
Glu	Ala					
	885		890		895	
Met	Thr	Gin	Phe	Gly	Met	Ser
Arg	His	Gly	Leu	Val	Gin	Leu
Phe	Arg					
	900		905		910	
Arg	Val	Gly	Val	Thr	Glu	Phe
Glu	Ala	Arg	Tyr	Gly	Thr	Leu
Pro	Pro					
	915		920		925	
Ala	Ser	Gin	Arg	Trp	Asp	Arg
lie	Leu	Gin	Ala	Ser	Gly	Met
Lys	Arg					

930	935	940	
Ala	LysProSerProThrSerAlaGinThrProAspGinThrSerLeu		
945	950	955	960
His	AlaPheAlaAspSerLeuGluArgAspLeuAspAlaProSerPro		
	965	970	975
Met	HisGluGlyAspGinThrArgAlaSerSerArgLysArg		
Ser	Arg		
	980	985	990
Ser	AspArgAlaValThrGlyProSerAlaGinGinAlaVal		
Glu	Val		
	995	1000	1005
Arg	ValProGluGinArgAspAlaLeuHisLeuProLeuSer		
Trp	Arg		
	1010	1015	1020
Val	LysArgProArgThrArglie	TrpGlyGlyLeuPro	
	AspProlie		
1025	1030	1035	1040
Ser	ArgSerGinLeuValLysSer	GluLeuGluGluLys	
	LysSerGlu		
	1045	1050	1055
Leu	ArgHisLysLeuLysTyrValProHisGluTyr	lieGlu	
Leu	lie		
	1060	1065	1070
Glu	lieAlaArgAsnSerThrGinAspArglieLeuGluMet		
Lys	Val		
	1075	1080	1085
Met	GluPhePheMetLysValTyrGlyTyrArgGlyLysHis		
Leu	Gly		
	1090	1095	1100
Gly	SerArgLysProAspGlyAla	lieTyrThrValGly	
	SerProlie		
1105	1110	1115	1120
Asp	TyrGlyVallieValAspThr	LysAlaTyrSerGly	
	GlyTyrAsn		
	1125	1130	1135

Leu Pro lie Gly Gin Ala Asp Glu Met Gin Arg Tyr Val Glu
Glu Asn

1140 1145 1150
Gin Thr Arg Asn Lys His lie Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys
Val Tyr

1155 1160 1165
Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly
His Phe

1170 1175 1180
Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu Thr Arg Leu Asn His lie
Thr Asn 1185 1190 1195 1200
Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu lie Gly
Gly Glu

1205 1210 1215
Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg
Lys Phe

1220 1225 1230
Asn Asn Gly Glu lie Asn Phe

1235

<210> 46

<211> 1239

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 46

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
 Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
 Pro Arg Arg 20 25 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro
 Asp Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu 50 55 60
 Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArg Leu Pro Ser
 65 70 75 80
 Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPhe Ser Asp Leu
 85 90 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
 Asp Ser

100	105	110	
Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala			
Glu Trp			
115	120	125	
Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro			
Pro Thr			
130	135	140	
Val ArgValAlaValThr Ala	AlaArgPro Pro	ArgAlaLys Pro	
Ala			
145	150	155	160
Pro Arg ArgArgAla Ala	GinProSer Asp	AlaSerPro	Ala
AlaGin			
165	170	175	
Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu			
Lys lie			
180	185	190	
Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala			
Leu Val			
195	200	205	
Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin			
His Pro			
210	215	220	
Ala Ala LeuGlyThr Val	AlaValThr Tyr	GinHislie lie	
ThrAla			
225	230	235	240
Leu Pro GluAlaThr His	GluAsplie Val	GlyValGly	Lys
GinTrp			
245	250	255	
Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly			
Glu Leu			
260	265	270	
Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys			
lie Ala			
275	280	285	
Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser			

Arg Asn
 290 295 300
 Ala Leu ThrGlyAla Pro LeuAsnLeu Thr ProAlaGin Val
 ValAla
 305 310 315 320
 lie Ala AsnAsnAsn Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val
 GinArg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 340 345 350
 Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin Val ValAlaAlie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala
 LeuGlu
 385 390 395 400
 Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly
 LeuThr
 405 410 415
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys
 Gin Ala
 420 425 430
 Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly
 435 440 445
 Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly
 Gly Lys
 450 455 460
 Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys
 GinAsp
 465 470 475 480

His Gly	LeuThrPro Asp	GinValVal Ala	lieAlaSer	Asn
GlyGly				
485		490	495	
Gly Lys	Gin Ala Leu Glu Thr Val	Gin Arg Leu Leu Pro Val		
Leu Cys				
500		505	510	
Gin Asp	His Gly Leu Thr Pro Asp	Gin Val Val Ala lie Ala		
Asn Asn				
515		520	525	
Asn Gly	Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val	Gin Arg Leu Leu		
Pro Val				
530		535	540	
Leu Cys	GinAspHis Gly	LeuThrPro Asp	GinValVal	Ala
lieAla				
545		550	555	560
Ser His	AspGlyGly Lys	GinAlaLeu Glu	ThrValGin	Arg
LeuLeu				
565		570	575	
Pro Val	Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr	Pro Asp Gin Val		
Val Ala				
580		585	590	
lie Ala	Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val			
Gin Arg				
595		600	605	

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
Gin Val

610	615	620	
Val Ala	lieAlaSerAsnlie	GlyGlyLysGinAlaLeuGluThr	Val
625	630	635	640
Gin Arg	LeuLeuProValLeuCysGinAspHisGlyLeuThrPro	Asp	
	645	650	655
Gin Val	Val Ala lie Ala Ser Asn lie	Gly Gly Lys Gin Ala	
Leu Glu			
	660	665	670
Thr Val	Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly		
Leu Thr			
	675	680	685
Pro Asp	Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys		
Gin Ala			
	690	695	700
Leu Glu	ThrValGinArgLeuLeuProValLeuCysGinAspHis	Gly	
705	710	715	720
Leu Thr	ProAspGinValValAlalieAlaSerHisAspGlyGly	Lys	
	725	730	735
Gin Ala	Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys		
Gin Asp			
	740	745	750
His Gly	Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His		
Asp Gly			
	755	760	765
Gly Lys	Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val		
Leu Cys			
	770	775	780
Gin Asp	HisGlyLeuThrProAspGinValValAlalieAlaSer	Asn	
785	790	795	800
Gly Gly	GlyLysGinAlaLeuGluSerlieValAlaGinLeuSer	Arg	
	805	810	815
Arg Asp	Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val		

Ala Leu

820 825 830

Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys
Gly Leu

835 840 845

Pro His Ala Pro Glu Phe lie Arg Arg Val Asn Arg Arg lie
Ala Glu

850 855 860

Arg Thr SerHisArgValAlaAspTyrAlaHisValValArgVal Leu
865 870 875 880

Glu Phe PheGinCysHisSerHisProAlaHisAlaPheAspGlu Ala
885 890 895

Met Thr Gin Phe Gly Met Ser Arg His Gly Leu Val Gin Leu
Phe Arg

900 905 910

Arg Val Gly Val Thr Glu Phe Glu Ala Arg Tyr Gly Thr Leu
Pro Pro

915 920 925

Ala Ser Gin Arg Trp Asp Arg lie Leu Gin Ala Ser Gly Met
Lys Arg

930 935 940

Ala Lys ProSerProThrSerAlaGinThrProAspGinThrSer Leu
945 950 955 960

His Ala PheAlaAspSerLeuGluArgAspLeuAspAlaProSer Pro
965 970 975

Met His Glu Gly Asp Gin Thr Arg Ala Ser Ser Arg Lys Arg
Ser Arg

980 985 990

Ser Asp Arg Ala Val Thr Gly Pro Ser Ala Gin Gin Ala Val
Glu Val

995 1000 1005

Arg Val Pro Glu Gin Arg Asp Ala Leu His Leu Pro Leu Ser
Trp Arg

1010 1015 1020

Val Lys Arg ProArg Thr Arg lie TrpGlyGly Leu Pro

```

      AspPro lie
1025          1030          1035          1040
Ser Arg Ser  GinLeu  Val Lys  Ser  GluLeuGlu Glu Lys
      LysSer Glu
          1045          1050          1055
Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr lie Glu
Leu lie
          1060          1065          1070
Glu lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin Asp Arg lie Leu Glu Met
Lys Val
          1075          1080          1085
Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His
Leu Gly
          1090          1095          1100
Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala lie Tyr Thr Val Gly Ser
Pro lie

```

1105	1110	1115	1120
Asp Tyr Gly Val	lie Val Asp Thr	Lys Ala Tyr Ser	Gly Gly Tyr Asn
	1125	1130	1135
Leu Pro lie Gly	Gin Ala Asp Glu	Met Gin Arg Tyr	Val Glu Glu Asn
	1140	1145	1150
Gin Thr Arg Asn	Lys His lie Asn	Pro Asn Glu Trp	Trp Lys Val Tyr
	1155	1160	1165
Pro Ser Ser Val	Thr Glu Phe Lys	Phe Leu Phe Val	Ser Gly His Phe
	1170	1175	1180
Lys Gly Asn Tyr	Lys Ala Gin Leu	Thr Arg Leu Asn	His lie Thr Asn
1185	1190	1195	1200
Cys Asn Gly Ala	Val Leu Ser Val	Glu Glu Leu Leu	lie Gly Gly Glu
	1205	1210	1215
Met lie Lys Ala	Gly Thr Leu Thr	Leu Glu Glu Val	Arg Arg Lys Phe
	1220	1225	1230
Asn Asn Gly Glu	lie Asn Phe		

1235

<210> 47

<211> 1239

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 47

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
 Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
 Pro Arg Arg 20 25 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
 Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu
 50 55 60
 Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeuProSer
 65 70 75 80
 Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSerAspLeu
 85 90 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
 Asp Ser
 100 105 110
 Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 Glu Trp
 115 120 125
 Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAla LysProAla
 145 150 155 160
 Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerPro AlaAlaGin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro
 210 215 220

Ala	Ala	Leu	Gly	Thr	Val	Ala	Val	Thr	Tyr	Gln	His	Leu	Leu	Thr	Ala
225					230					235					240
Leu	Pro	Glu	Ala	Thr	His	Glu	Asp	Leu	Val	Gly	Val	Gly	Lys	Gln	Trp
				245					250					255	
Ser	Gly	Ala	Arg	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Thr	Asp	Ala	Gly		
Glu	Leu														
				260					265					270	
Arg	Gly	Pro	Pro	Leu	Gln	Leu	Asp	Thr	Gly	Gln	Leu	Val	Lys		
Leu	Ala														

275	280	285			
Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser					
Arg Asn					
290	295	300			
Ala Leu ThrGlyAla Pro LeuAsnLeu Thr ProAlaGin Val					
ValAla					
305	310	315	320		
lie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val					
GinArg					
325	330	335			
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp					
Gin Val					
340	345	350			
Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu					
Thr Val					
355	360	365			
Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr					
Pro Asp					
370	375	380			
Gin Val ValAlaAlie Ala SerAsnGly Gly GlyLysGin Ala					
LeuGlu					
385	390	395	400		
Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly					
LeuThr					
405	410	415			
Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly Gly Lys					
Gin Ala					
420	425	430			
Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp					
His Gly					
435	440	445			
Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly					
Gly Lys					
450	455	460			
Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys					

GinAsp
 465 470 475 480
 His Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala lieAlaSer His
 AspGly
 485 490 495
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 500 505 510
 Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
 Ser His
 515 520 525
 Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
 Pro Val
 530 535 540
 Leu Cys GinAspHis Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala
 lieAla
 545 550 555 560
 Asn Asn AsnGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
 LeuLeu
 565 570 575
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 580 585 590
 lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 595 600 605
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 610 615 620
 Val Ala lieAlaSer Asn lieGlyGly Lys GinAlaLeu Glu
 ThrVal
 625 630 635 640
 Gin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Asp HisGlyLeu Thr
 ProAsp
 645 650 655

Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala
Leu Glu

660

665

670

Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly
Leu Thr

675

680

685

Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly Gly Lys
Gin Ala

690

695

700

Leu Glu ThrValGin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Asp
HisGly

705

710

715

720

Leu Thr ProAspGin Val ValAlaliele Ala SerAsnlie Gly
GlyLys

725

730

735

Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
Gin Asp

740

745

750

His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn
Gly Gly

755

760

765

Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
Leu Cys

770

775

780

Gin AspHisGlyLeuThrProAspGinValValAla lieAlaSerAsn

 785 790 795 800
 Gly GlyGlyLysGinAlaLeuGluSer lieValAlaGinLeuSerArg

 805 810 815
 Arg Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val
 Ala Leu

 820 825 830
 Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys
 Gly Leu

 835 840 845
 Pro His Ala Pro Glu Phe lie Arg Arg Val Asn Arg Arg lie
 Ala Glu

 850 855 860
 Arg ThrSerHisArgValAlaAspTyrAlaHisValValArgValLeu
 865 870 875 880
 Glu PhePheGinCysHisSerHisProAlaHisAlaPheAspGluAla

 885 890 895
 Met Thr Gin Phe Gly Met Ser Arg His Gly Leu Val Gin Leu
 Phe Arg

 900 905 910
 Arg Val Gly Val Thr Glu Phe Glu Ala Arg Tyr Gly Thr Leu
 Pro Pro

 915 920 925
 Ala Ser Gin Arg Trp Asp Arg lie Leu Gin Ala Ser Gly Met
 Lys Arg

 930 935 940
 Ala LysProSerProThrSerAlaGinThrProAspGinThrSerLeu
 945 950 955 960
 His AlaPheAlaAspSerLeuGluArgAspLeuAspAlaProSerPro

 965 970 975
 Met His Glu Gly Asp Gin Thr Arg Ala Ser Ser Arg Lys Arg
 Ser Arg

 980 985 990
 Ser Asp Arg Ala Val Thr Gly Pro Ser Ala Gin Gin Ala Val

Glu Val
 995 1000 1005
 Arg Val Pro Glu Gin Arg Asp Ala Leu His Leu Pro Leu Ser
 Trp Arg
 1010 1015 1020
 Val Lys Arg ProArg Thr Arg lie TrpGlyGly Leu Pro
 AspPro lie
 1025 1030 1035 1040
 Ser Arg Ser GinLeu Val Lys Ser GluLeuGlu Glu Lys
 LysSer Glu
 1045 1050 1055
 Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr lie Glu
 Leu lie
 1060 1065 1070
 Glu lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin Asp Arg lie Leu Glu Met
 Lys Val
 1075 1080 1085
 Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His
 Leu Gly
 1090 1095 1100
 Gly Ser Arg LysPro Asp Gly Ala lieTyrThr Val Gly
 SerPro lie
 1105 1110 1115 1120
 Asp Tyr Gly Vallie Val Asp Thr LysAlaTyr Ser Gly
 GlyTyr Asn
 1125 1130 1135
 Leu Pro lie Gly Gin Ala Asp Glu Met Gin Arg Tyr Val Glu
 Glu Asn
 1140 1145 1150
 Gin Thr Arg Asn Lys His lie Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys
 Val Tyr
 1155 1160 1165
 Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly
 His Phe
 1170 1175 1180

Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu Thr Arg Leu Asn His lie
 Thr Asn 1185 1190 1195 1200
 Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu lie Gly
 Gly Glu
 1205 1210 1215
 Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg
 Lys Phe
 1220 1225 1230
 Asn Asn Gly Glu lie Asn Phe

1235

<210> 48

<211> 1239

<212> PRT

<213> Yapay

Dizi <220>

<223> sentetik

<400> 48

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
 Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
 Pro Arg Arg 20 25 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
 Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu
 50 55 60
 Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeuProSer
 65 70 75 80
 Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSerAspLeu
 85 90 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
 Asp Ser
 100 105 110
 Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 Glu Trp
 115 120 125
 Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
 145 150 155 160
 Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAlaAlaGin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro
 210 215 220

Ala AlaLeu Gly Thr Val Ala Val Thr TyrGin His lie lie ThrAla
 225 230 235 240
 Leu ProGluAla Thr His Glu Asp lieValGly ValGly LysGinTrp
 245 250 255
 Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly
 Glu Leu
 260 265 270
 Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys
 lie Ala
 275 280 285
 Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
 Arg Asn
 290 295 300
 Ala LeuThr GlyAla ProLeuAsnLeuThrPro Ala GinValValAla
 305 310 315 320
 lie AlaSerHisAspGlyGlyLysGinAlaLeu GluThrValGinArg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 340 345 350
 Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin ValValAla lieAlaAsnAsnAsnGlyGly LysGinAlaLeuGlu
 385 390 395 400
 Thr ValGinArgLeuLeuProValLeuCysGin AspHisGlyLeuThr
 405 410 415
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
 Gin Ala
 420 425 430
 Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly

435	440	445
Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly		
Gly Lys		

450		455		460	
Gin Ala	LeuGluThr Val	GinArgLeu Leu	ProValLeu	Cys	
	GinAsp				
465		470		475	480
His Gly	LeuThrPro Asp	GinValVal Ala	lieAlaSer	Asn	
	GlyGly				
	485	490		495	
Gly Lys	Gin Ala Leu Glu Thr Val	Gin Arg Leu Leu Pro Val			
Leu Cys					
	500	505		510	
Gin Asp	His Gly Leu Thr Pro Asp	Gin Val Val Ala lie Ala			
Asn Asn					
	515	520		525	
Asn Gly	Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val	Gin Arg Leu Leu			
Pro Val					
	530	535		540	
Leu Cys	GinAspHis Gly	LeuThrPro Asp	GinValVal	Ala	
	lieAla				
545		550		555	560
Ser His	AspGlyGly Lys	GinAlaLeu Glu	ThrValGin	Arg	
	LeuLeu				
	565	570		575	
Pro Val	Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr	Pro Asp Gin Val			
Val Ala					
	580	585		590	
lie Ala	Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val				
Gin Arg					
	595	600		605	
Leu Leu	Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp				
Gin Val					
	610	615		620	
Val Ala	lieAlaSer Asn	lieGlyGly Lys	GinAlaLeu	Glu	
	ThrVal				
625		630		635	640
Gin Arg	LeuLeuPro Val	LeuCysGin Asp	HisGlyLeu	Thr	

ProAsp
 645 650 655
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala
 Leu Glu
 660 665 670
 Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly
 Leu Thr
 675 680 685
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 Gin Ala
 690 695 700
 Leu Glu ThrValGin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Asp
 HisGly
 705 710 715 720
 Leu Thr ProAspGin Val ValAlalialie Ala AsnAsnAsn Gly
 GlyLys
 725 730 735
 Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 Gin Asp
 740 745 750
 His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn
 Gly Gly
 755 760 765
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 770 775 780
 Gin Asp HisGlyLeu Thr ProAspGin Val ValAlalialie Ala
 SerAsn
 785 790 795 800
 Gly Gly GlyLysGin Ala LeuGluSer lie ValAlaGin Leu
 SerArg
 805 810 815
 Arg Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val
 Ala Leu
 820 825 830

Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp Ala Val Lys Lys
Gly Leu

835

840

845

Pro His Ala Pro Glu Phe lie Arg Arg Val Asn Arg Arg lie
Ala Glu

850

855

860

Arg Thr SerHisArg Val AlaAspTyr Ala HisValVal Arg
ValLeu

865

870

875

880

Glu Phe PheGinCys His SerHisPro Ala HisAlaPhe Asp
GluAla

885

890

895

Met Thr Gin Phe Gly Met Ser Arg His Gly Leu Val Gin Leu
Phe Arg

900

905

910

Arg Val Gly Val Thr Glu Phe Glu Ala Arg Tyr Gly Thr Leu
Pro Pro

915

920

925

Ala Ser Gin Arg Trp Asp Arg lie Leu Gin Ala Ser Gly Met
Lys Arg

930

935

940

Ala Lys Pro Ser Pro Thr Ser Ala Gin Thr Pro Asp Gin Thr
Ser Leu 945 950 955 960

His Ala Phe Ala Asp Ser Leu Glu Arg Asp Leu Asp Ala
 Pro Ser Pro 965 970 975
 Met His Glu Gly Asp Gin Thr Arg Ala Ser Ser Arg Lys
 Arg Ser Arg 980 985 990
 Ser Asp Arg Ala Val Thr Gly Pro Ser Ala Gin Gin Ala Val
 Glu Val 995 1000 1005
 Arg Val Pro Glu Gin Arg Asp Ala Leu His Leu Pro Leu Ser
 Trp Arg
 1010 1015 1020
 Val Lys Arg ProArg Thr Arg lie TrpGlyGly Leu Pro
 AspPro lie
 1025 1030 1035 1040
 Ser Arg Ser GinLeu Val Lys Ser GluLeuGlu Glu Lys
 LysSer Glu
 1045 1050 1055
 Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr lie Glu
 Leu lie
 1060 1065 1070
 Glu lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin Asp Arg lie Leu Glu Met
 Lys Val
 1075 1080 1085
 Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His
 Leu Gly
 1090 1095 1100
 Gly Ser Arg LysPro Asp Gly Ala lieTyrThr Val Gly
 SerPro lie
 1105 1110 1115 1120
 Asp Tyr Gly Vallie Val Asp Thr LysAlaTyr Ser Gly
 GlyTyr Asn
 1125 1130 1135
 Leu Pro lie Gly Gin Ala Asp Glu Met Gin Arg Tyr Val Glu
 Glu Asn
 1140 1145 1150
 Gin Thr Arg Asn Lys His lie Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys
 Val Tyr

1155	1160	1165
Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly		
His Phe		
1170	1175	1180
Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu Thr Arg Leu Asn His lie		
Thr Asn 1185	1190	1195 1200
Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu lie Gly		
Gly Glu		
1205	1210	1215
Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg		
Lys Phe		
1220	1225	1230
Asn Asn Gly Glu lie Asn Phe		

1235

<210> 49

<211> 1273

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 49

Met	Ala	Ser	Ser	Pro	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Ser			
Trp	Lys	Asp	15			10					15				
Ala	Ser	Gly	Trp	Ser	Arg	Met	His	Ala	Asp	Pro	lie	Arg			
				Pro	Arg	Arg	20	25			30				
Pro	Ser	Pro	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Gly	Pro	Gin	Pro			
		Asp	Arg	Val	35	40				45					
Gin	Pro	Thr	Ala	Asp	Arg	Gly	Val	Ser	Ala	Pro	Ala	Gly	Ser		
	Pro	Leu	50			55				60					
Asp	Gly	Leu	Pro	Ala	Arg	Arg	Thr	Val	Ser	Arg	Thr	Arg	Leu	Pro	Ser
65					70				75				80		
Pro	Pro	Ala	Pro	Ser	Pro	Ala	Phe	Ser	Ala	Gly	Ser	Phe	Ser	Asp	Leu
					85				90				95		
Leu	Arg	Pro	Phe	Asp	Pro	Ser	Leu	Leu	Asp	Thr	Ser	Leu	Leu		
Asp	Ser														
					100				105				110		
Met	Pro	Ala	Val	Gly	Thr	Pro	His	Thr	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala		
Glu	Trp														
					115				120				125		

Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
Pro Thr

130 135 140
Val ArgValAlaValThr Ala AlaArgPro Pro ArgAlaLys Pro
Ala

145 150 155 160
Pro Arg ArgArgAla Ala GinProSer Asp AlaSerPro Ala
AlaGin

165 170 175
Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
Lys lie

180 185 190
Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
Leu Val

195 200 205
Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
His Pro

210 215 220
Ala Ala LeuGlyThr Val AlaValThr Tyr GinHislie lie
ThrAla

225 230 235 240
Leu Pro GluAlaThr His GluAsplie Val GlyValGly Lys
GinTrp

245 250 255
Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly
Glu Leu

260 265 270
Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys
lie Ala

275 280 285
Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
Arg Asn

290 295 300
Ala Leu ThrGlyAla Pro LeuAsnLeu Thr ProAlaGin Val

ValAla
 305 310 315 320
 lie Ala SerAsnlie Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val
 GinArg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 340 345 350
 Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin Val ValAlalie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala
 LeuGlu
 385 390 395 400
 Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly
 LeuThr
 405 410 415
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 Gin Ala
 420 425 430
 Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly
 435 440 445
 Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly
 Gly Lys
 450 455 460
 Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys
 GinAsp
 465 470 475 480
 His Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala lieAlaSer Asn
 GlyGly
 485 490 495

Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
Leu Cys

500

505

510

Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
Ser His

515

520

525

Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
Pro Val

530

535

540

Leu Cys GinAspHis Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala
lieAla

545

550

555

560

Ser Asn GlyGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
LeuLeu

565

570

575

Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
Val Ala

580

585

590

lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
Gin Arg

595

600

605

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
Gin Val

610

615

620

Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
Thr Val

625	630	635	640
Gin Arg Leu	Leu Pro Val	Leu Cys Gin Asp	His Gly Leu Thr
Pro Asp			
	645	650	655
Gin Val Val	Ala lie Ala	Asn Asn Asn Gly	Gly Lys Gin Ala
Leu Glu			
	660	665	670
Thr Val Gin	Arg Leu Leu Pro	Val Leu Cys Gin	Asp His Gly
Leu Thr			
	675	680	685
Pro Asp Gin	Val Val Ala lie	Ala Ser His Asp	Gly Gly Lys
Gin Ala			
	690	695	700
Leu Glu	ThrValGin	ArgLeuLeuProVal	LeuCysGinAspHis Gly
705		710	715
			720
Leu Thr	ProAspGin	ValValAlaAlie	AlaSerAsnGlyGlyGly Lys
	725	730	735
Gin Ala Leu	Glu Thr Val	Gin Arg Leu Leu	Pro Val Leu Cys
Gin Asp			
	740	745	750
His Gly Leu	Thr Pro Asp	Gin Val Val	Ala lie Ala Ser Asn
Gly Gly			
	755	760	765
Gly Lys Gin	Ala Leu Glu	Thr Val Gin	Arg Leu Leu Pro Val
Leu Cys			
	770	775	780
Gin Asp	HisGlyLeu	ThrProAspGin	ValValAlaAlieAlaSer His
785		790	795
			800
Asp Gly	GlyLysGin	AlaLeuGluThr	ValGinArgLeuLeuPro Val
	805	810	815
Leu Cys Gin	Asp His Gly	Leu Thr Pro	Asp Gin Val Val Ala
lie Ala			
	820	825	830
Ser Asn Gly	Gly Gly Lys	Gin Ala Leu	Glu Ser lie Val Ala
Gin Leu			

835	840	845	
Ser Arg Arg Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His			
Leu Val			
850	855	860	
Ala Leu	AlaCysLeuGlyGlyArgProAlaLeuAspAlaValLys	Lys	
865	870	875	880
Gly Leu	ProHisAlaProGluPheIleArgArgValAsnArgArg	lie	
	885	890	895
Ala Glu Arg Thr Ser His Arg Val Ala Asp Tyr Ala His Val			
Val Arg			
900	905	910	
Val Leu Glu Phe Phe Gin Cys His Ser His Pro Ala His Ala			
Phe Asp			
915	920	925	
Glu Ala Met Thr Gin Phe Gly Met Ser Arg His Gly Leu Val			
Gin Leu			
930	935	940	
Phe Arg	ArgValGlyValThrGluPheGluAlaArgTyrGlyThr	Leu	
945	950	955	960
Pro Pro	AlaSerGinArgTrpAspArgIleLeuGinAlaSerGly	Met	
	965	970	975
Lys Arg Ala Lys Pro Ser Pro Thr Ser Ala Gin Thr Pro Asp			
Gin Thr			
980	985	990	
Ser Leu His Ala Phe Ala Asp Ser Leu Glu Arg Asp Leu Asp			
Ala Pro			
995	1000	1005	
Ser Pro Met His Glu Gly Asp Gin Thr Arg Ala Ser Ser Arg			
Lys Arg			
1010	1015	1020	
Ser Arg Ser AspArg	Ala Val Thr	GlyProSer Ala Gin	
	GinAla Val		
1025	1030	1035	1040
Glu Val Arg ValPro	Glu Gin Arg	AspAlaLeu His Leu	
	ProLeu Ser		

	1045	1050	1055
Trp Arg Val Lys Arg Pro Arg Thr Arg	lie	Trp Gly Gly Leu	
Pro Asp			
	1060	1065	1070
Pro lie Ser Arg Ser Gin Leu Val Lys Ser	Glu Leu Glu Glu		
Lys Lys			
	1075	1080	1085
Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val	Pro His Glu Tyr		
lie Glu			
	1090	1095	1100
Leu lie Glu lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin	Asp Arg lie Leu		
Glu Met 1105	1110	1115	1120
Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr	Gly Tyr Arg Gly		
Lys His			
	1125	1130	1135

Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala lie Tyr Thr
 Val Gly Ser 1140 1145 1150
 Pro lie Asp Tyr Gly Val lie Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser
 Gly Gly 1155 1160 1165
 Tyr Asn Leu Pro lie Gly Gin Ala Asp Glu Met Gin Arg Tyr
 Val Glu
 1170 1175 1180
 Glu Asn Gin Thr Arg Asn Lys His lie Asn Pro Asn Glu Trp
 Trp Lys 1185 1190 1195 1200
 Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val
 Ser Gly
 1205 1210 1215
 His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu Thr Arg Leu Asn
 His lie
 1220 1225 1230
 Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu
 lie Gly
 1235 1240 1245
 Gly Glu Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val
 Arg Arg
 1250 1255 1260
 Lys Phe Asn Asn Gly Glu lie Asn Phe 1265 1270

<210> 50

<211> 1273

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 50

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
 Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
 Pro Arg Arg 20 25 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
 Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu
 50 55 60
 Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeuProSer
 65 70 75 80
 Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSerAspLeu
 85 90 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
 Asp Ser
 100 105 110
 Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 Glu Trp
 115 120 125
 Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
 145 150 155 160
 Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAlaAlaGin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro
 210 215 220

Ala	Ala	Leu	Gly	Thr	Val	Ala	Val	Thr	Tyr	Gln	His	Leu	Leu	Thr	Ala
225					230					235					240
Leu	Pro	Glu	Ala	Thr	His	Glu	Asp	Leu	Val	Gly	Val	Gly	Lys	Gln	Trp
				245					250					255	
Ser	Gly	Ala	Arg	Ala	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Thr	Asp	Ala	Gly		
Glu	Leu														
				260					265					270	

Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys
 lie Ala 275 280 285
 Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
 Arg Asn
 290 295 300
 Ala Leu ThrGlyAla Pro LeuAsnLeu Thr ProAlaGin Val
 ValAla
 305 310 315 320
 lie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val
 GinArg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 340 345 350
 Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin Val ValAlalie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala
 LeuGlu
 385 390 395 400
 Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly
 LeuThr
 405 410 415
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 Gin Ala
 420 425 430
 Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly
 435 440 445
 Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Asn Gly
 Gly Lys
 450 455 460

Gin	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys
GinAsp													
465		470				475				480			
His	Gly	Leu	Thr	Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	Asn
lieGly													
485				490				495					
Gly	Lys	Gin	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val
Leu Cys													
500				505				510					
Gin	Asp	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala
Ser Asn													
515				520				525					
lie	Gly	Gly	Lys	Gin	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu
Pro Val													
530		535				540							
Leu	Cys	Gin	Asp	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala
lieAla													
545		550				555				560			
Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys	Gin	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg
LeuLeu													
565				570				575					
Pro	Val	Leu	Cys	Gin	Asp	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Asp	Gin	Val
Val Ala													
580				585				590					
lie	Ala	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys	Gin	Ala	Leu	Glu	Thr	Val
Gin Arg													
595				600				605					
Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gin	Asp	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Asp
Gin Val													
610		615				620							
Val	Ala	lie	Ala	Ser	His	Asp	Gly	Gly	Lys	Gin	Ala	Leu	Glu
ThrVal													
625		630				635				640			
Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gin	Asp	His	Gly	Leu	Thr
ProAsp													

no	775	780	
Gin Asp	HisGlyLeuThrProAspGinValValAlaAlieAlaSer	His	
785	790	795	800
Asp Gly	GlyLysGinAlaLeuGluThrValGinArgLeuLeuPro	Val	
	805	810	815
Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala			
lie Ala			
	820	825	830
Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Ser lie Val Ala			
Gin Leu			
	835	840	845
Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His			
Leu Val			
	850	855	860
Ala Leu	AlaCysLeuGlyGlyArgProAlaMetAspAlaValLys	Lys	
865	870	875	880
Gly Leu	ProHisAlaProGluLeulieArgArgValAsnArgArg	lie	
	885	890	895
Gly Glu Arg Thr Ser His Arg Val Ala Asp Tyr Ala Gin Val			
Val Arg			
	900	905	910
Val Leu Glu Phe Phe Gin Cys His Ser His Pro Ala Tyr Ala			
Phe Asp			
	915	920	925
Glu Ala Met Thr Gin Phe Gly Met Ser Arg Asn Gly Leu Val			
Gin Leu			
	930	935	940
Phe Arg	ArgValGlyValThrGluLeuGluAlaArgGlyGlyThr	Leu	
945	950	955	960
Pro Pro	AlaSerGinArgTrpAspArglieLeuGinAlaSerGly	Met	
	965	970	975
Lys Arg Ala Lys Pro Ser Pro Thr Ser Ala Gin Thr Pro Asp			
Gin Ala			
	980	985	990
Ser Leu His Ala Phe Ala Asp Ser Leu Glu Arg Asp Leu Asp			

Ala Pro

995 1000 1005

Ser Pro Met His Glu Gly Asp Gin Thr Arg Ala Ser Ser Arg
Lys Arg

1010 1015 1020

Ser Arg Ser AspArg Ala Val Thr GlyProSer Ala Gin
GinAla Val

1025 1030 1035 1040

Glu Val Arg ValPro Glu Gin Arg AspAlaLeu His Leu
ProLeu Ser

1045 1050 1055

Trp Arg Val Lys Arg Pro Arg Thr Arg lie Trp Gly Gly Leu
Pro Asp

1060 1065 1070

Pro lie Ser Arg Ser Gin Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu
Lys Lys

1075 1080 1085

Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr
lie Glu

1090 1095 1100

Leu lie Glu lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin Asp Arg lie Leu
Glu Met 1105 1110 1115 1120

Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly
Lys His

1125 1130 1135

Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala lie Tyr Thr Val
Gly Ser

1140 1145 1150

Pro lie Asp Tyr Gly Val lie Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser
Gly Gly

1155 1160 1165

Tyr Asn Leu Pro lie Gly Gin Ala Asp Glu Met Gin Arg Tyr
Val Glu

1170 1175 1180

Glu Asn Gin Thr Arg Asn Lys His lie Asn Pro Asn Glu Trp

```

Trp Lys 1185      1190                      1195                      1200
Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val
Ser Gly

                      1205                      1210                      1215
His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu Thr Arg Leu Asn
His lie

                      1220                      1225                      1230
Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu
lie Gly

                      1235                      1240                      1245
Gly Glu Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val
Arg Arg

                      1250                      1255                      1260
Lys Phe Asn Asn Gly Glu lie
Asn Phe 1265      1270

```

<210> 51

<211> 1273

<212> PRT

<213> Yapay

Dizi <220>

<223> sentetik

<400> 51

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
 Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
 Pro Arg Arg 20 25 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
 Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu
 50 55 60
 Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeuProSer
 65 70 75 80
 Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSerAspLeu
 85 90 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
 Asp Ser
 100 105 110
 Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 Glu Trp
 115 120 125
 Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
 145 150 155 160
 Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAlaAlaGin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro
 210 215 220

Ala AlaLeu Gly Thr Val Ala Val Thr TyrGin His lie lie ThrAla
 225 230 235 240
 Leu ProGluAla Thr His Glu Asp lieValGly ValGly Lys GinTrp
 245 250 255
 Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly
 Glu Leu
 260 265 270
 Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys
 lie Ala
 275 280 285
 Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
 Arg Asn
 290 295 300
 Ala LeuThr GlyAla ProLeuAsnLeu ThrPro Ala GinValValAla
 305 310 315 320
 lie AlaSerAsn lieGlyGlyLysGinAlaLeu Glu ThrValGinArg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 340 345 350
 Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin ValValAla lieAlaSerAsnGlyGlyGly LysGinAlaLeuGlu
 385 390 395 400
 Thr ValGinArgLeuLeuProValLeuCysGin AspHisGlyLeuThr
 405 410 415

Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly
 Gly Lys Gin Ala 420 425
 430
 Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly 435 440 445
 Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly
 Gly Lys
 450 455 460
 Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys
 GinAsp
 465 470 475 480
 His Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala lieAlaSer His
 AspGly
 485 490 495
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 500 505 510
 Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
 Ser His
 515 520 525
 Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
 Pro Val
 530 535 540
 Leu Cys GinAspHis Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala
 lieAla
 545 550 555 560
 Ser Asn lieGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
 LeuLeu
 565 570 575
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 580 585 590
 lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 595 600 605

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 610 615 620
 Val Ala lieAlaAsn Asn AsnGlyGly Lys GinAlaLeu Glu
 ThrVal
 625 630 635 640
 Gin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Asp HisGlyLeu Thr
 ProAsp
 645 650 655
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala
 Leu Glu
 660 665 670
 Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly
 Leu Thr
 675 680 685
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly Gly Lys
 Gin Ala
 690 695 700
 Leu Glu ThrValGin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Asp
 HisGly
 705 710 715 720
 Leu Thr ProAspGin Val ValAlalie Ala SerHisAsp Gly
 GlyLys
 725 730 735
 Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 Gin Asp
 740 745 750
 His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn
 Gly Gly
 755 760 765
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 770 775 780
 Gin Asp HisGlyLeu Thr ProAspGin Val ValAlalie Ala
 SerHis

785		790		795		800
Asp Gly	GlyLysGin	Ala	LeuGluThr	Val	GinArgLeu	Leu
	ProVal					
	805		810		815	
Leu Cys	Gin Asp	His Gly	Leu Thr	Pro Asp	Gin Val	Val Ala
lie Ala						
	820		825		830	
Ser Asn	Gly Gly	Gly Lys	Gin Ala	Leu Glu	Ser lie	Val Ala
Gin Leu						
	835		840		845	
Ser Arg	Arg Asp	Pro Ala	Leu Ala	Ala Leu	Thr Asn	Asp His
Leu Val						
	850		855		860	
Ala Leu	AlaCysLeu	Gly	GlyArgPro	Ala	LeuAspAla	Val
	LysLys					
865		870		875		880
Gly Leu	ProHisAla	Pro	GluPhelie	Arg	ArgValAsn	Arg
	Arglie					
	885		890		895	
Ala Glu	Arg Thr	Ser His	Arg Val	Ala Asp	Tyr Ala	His Val
Val Arg						
	900		905		910	
Val Leu	Glu Phe	Phe Gin	Cys His	Ser His	Pro Ala	His Ala
Phe Asp						

915	920	925	
Glu Ala Met Thr Gin Phe Gly Met Ser Arg His Gly Leu Val			
Gin Leu			
930	935	940	
Phe ArgArgVal GlyVal Thr Glu Phe Glu Ala Arg Tyr Gly ThrLeu			
945	950	955	960
Pro ProAla Ser GinArg Trp Asp Arg lie Leu Gin Ala Ser GlyMet			
965	970	975	
Lys Arg Ala Lys Pro Ser Pro Thr Ser Ala Gin Thr Pro Asp			
Gin Thr			
980	985	990	
Ser Leu His Ala Phe Ala Asp Ser Leu Glu Arg Asp Leu Asp			
Ala Pro			
995	1000	1005	
Ser Pro Met His Glu Gly Asp Gin Thr Arg Ala Ser Ser Arg			
Lys Arg			
1010	1015	1020	
Ser Arg Ser AspArg Ala Val Thr GlyProSer Ala Gin			
GinAla Val			
1025	1030	1035	1040
Glu Val Arg ValPro Glu Gin Arg AspAlaLeu His Leu			
ProLeu Ser			
1045	1050	1055	
Trp Arg Val Lys Arg Pro Arg Thr Arg lie Trp Gly Gly Leu			
Pro Asp			
1060	1065	1070	
Pro lie Ser Arg Ser Gin Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu			
Lys Lys			
1075	1080	1085	
Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr			
lie Glu			
1090	1095	1100	
Leu lie Glu lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin Asp Arg lie Leu			
Glu Met 1105	1110	1115	1120
Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly			

Lys His

1125 1130 1135
Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala lie Tyr Thr Val
Gly Ser

1140 1145 1150
Pro lie Asp Tyr Gly Val lie Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser
Gly Gly

1155 1160 1165
Tyr Asn Leu Pro lie Gly Gin Ala Asp Glu Met Gin Arg Tyr
Val Glu

1170 1175 1180
Glu Asn Gin Thr Arg Asn Lys His lie Asn Pro Asn Glu Trp
Trp Lys 1185 1190 1195 1200
Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val
Ser Gly

1205 1210 1215
His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu Thr Arg Leu Asn
His lie

1220 1225 1230
Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu
lie Gly

1235 1240 1245
Gly Glu Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val
Arg Arg

1250 1255 1260
Lys Phe Asn Asn Gly Glu lie
Asn Phe 1265 1270

<210> 52

<211> 1307

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 52

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
 Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
 Pro Arg Arg 20 25 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
 Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu

50	55	60	
Asp Gly	LeuProAlaArgArgThrValSer	ArgThrArgLeuPro	Ser
65	70	75	80
Pro Pro	AlaProSerProAlaPheSerAla	GlySerPheSerAsp	Leu
	85	90	95
Leu Arg	Pro Phe Asp Pro Ser	Leu Leu Asp Thr	Ser Leu Leu
Asp Ser			
	100	105	110
Met Pro	Ala Val Gly Thr Pro His	Thr Ala Ala Ala	Pro Ala
Glu Trp			
	115	120	125
Asp Glu	Ala Gin Ser Ala Leu Arg	Ala Ala Asp Asp	Pro Pro
Pro Thr			
	130	135	140
Val Arg	ValAlaValThrAlaAlaArgProPro	ArgAlaLysProAla	
145	150	155	160
Pro Arg	ArgArgAlaAlaGinProSerAsp	AlaSerProAlaAla	Gin
	165	170	175
Val Asp	Leu Arg Thr Leu Gly Tyr	Ser Gin Gin Gin	Glu
Lys lie			
	180	185	190
Lys Pro	Lys Val Arg Ser Thr Val	Ala Gin His His	Glu Ala
Leu Val			
	195	200	205
Gly His	Gly Phe Thr His Ala His	lie Val Ala Leu	Ser Gin
His Pro			
	210	215	220
Ala Ala	LeuGlyThrValAlaValThrTyr	GinHislieliethr	Ala
225	230	235	240
Leu Pro	GluAlaThrHisGluAsplieVal	GlyValGlyLysGin	Trp
	245	250	255
Ser Gly	Ala Arg Ala Leu Glu Ala	Leu Leu Thr Asp	Ala Gly
Glu Leu			
	260	265	270
Arg Gly	Pro Pro Leu Gin Leu Asp	Thr Gly Gin Leu	Val Lys

lie Ala
 275 280 285
 Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
 Arg Asn
 290 295 300
 Ala Leu Thr Gly Ala Pro Leu Asn Leu Thr Pro Ala Gin Val Val Ala
 305 310 315 320
 lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 340 345 350
 Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 385 390 395 400
 Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 405 410 415
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 Gin Ala
 420 425 430
 Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly
 435 440 445
 Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly
 Gly Lys
 450 455 460
 Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 465 470 475 480
 His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly
 485 490 495

Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
Leu Cys

500

505

510

Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
Asn Asn

515

520

525

Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
Pro Val

530

535

540

Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala
lie Ala 545 550 555 560

Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg Leu Leu 565 570
 575
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val Val Ala 580 585
 590
 lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg 595 600 605
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 610 615 620
 Val Ala lieAlaAsn Asn AsnGlyGly Lys GinAlaLeu Glu
 ThrVal
 625 630 635 640
 Gin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Asp HisGlyLeu Thr
 ProAsp
 645 650 655
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala
 Leu Glu
 660 665 670
 Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly
 Leu Thr
 675 680 685
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Asn Asn Asn Gly Gly Lys
 Gin Ala
 690 695 700
 Leu Glu ThrValGin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Asp
 HisGly
 705 710 715 720
 Leu Thr ProAspGin Val ValAlaAla lie Ala AsnAsnAsn Gly
 GlyLys
 725 730 735
 Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 Gin Asp
 740 745 750

His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn
 lie Gly
 755 760 765
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 770 775 780
 Gin Asp HisGlyLeu Thr ProAspGin Val ValAlalie Ala
 AsnAsn
 785 790 795 800
 Asn Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu
 ProVal
 805 810 815
 Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala
 lie Ala
 820 825 830
 Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg
 Leu Leu
 835 840 845
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 850 855 860
 lie Ala SerAsnGly Gly GlyLysGin Ala LeuGluSer lie
 ValAla
 865 870 875 880
 Gin Leu SerArgArg Asp ProAlaLeu Ala AlaLeuThr Asn
 AspHis
 885 890 895
 Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Leu Asp
 Ala Val
 900 905 910
 Lys Lys Gly Leu Pro His Ala Pro Glu Phe lie Arg Arg Val
 Asn Arg
 915 920 925
 Arg lie Ala Glu Arg Thr Ser His Arg Val Ala Asp Tyr Ala
 His Val

930	935	940			
Val ArgValLeuGluPhe Phe	GinCysHis Ser	HisProAla	His		
Ala					
945	950	955	960		
Phe Asp GluAlaMet Thr	GinPheGly Met	SerArgHis	Gly		
LeuVal					
965	970	975			
Gin Leu Phe Arg Arg Val Gly Val Thr Glu Phe Glu Ala Arg					
Tyr Gly					
980	985	990			
Thr Leu Pro Pro Ala Ser Gin Arg Trp Asp Arg lie Leu Gin					
Ala Ser					
995	1000	1005			
Gly Met Lys Arg Ala Lys Pro Ser Pro Thr Ser Ala Gin Thr					
Pro Asp					
1010	1015	1020			
Gin Thr Ser Leu His Ala Phe Ala Asp Ser Leu Glu Arg Asp					
Leu Asp 1025	1030	1035	1040		
Ala Pro Ser Pro Met His Glu Gly Asp Gin Thr Arg Ala Ser					
Ser Arg					
1045	1050	1055			
Lys Arg Ser Arg Ser Asp Arg Ala Val Thr Gly Pro Ser Ala					
Gin Gin					

1060	1065	1070
Ala Val Glu Val Arg Val Pro Glu Gin Arg Asp Ala Leu His		
Leu Pro		
1075	1080	1085
Leu Ser Trp Arg Val Lys Arg Pro Arg Thr Arg lie Trp Gly		
Gly Leu		
1090	1095	1100
Pro Asp Pro lieSer Arg Ser Gin LeuValLys Ser Glu		
LeuGlu Glu		
1105	1110	1115
Lys Lys Ser GluLeu Arg His Lys LeuLysTyr Val Pro		
HisGlu Tyr		
1125	1130	1135
lie Glu Leu lie Glu lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin Asp Arg		
lie Leu		
1140	1145	1150
Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr		
Arg Gly		
1155	1160	1165
Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala lie Tyr		
Thr Val		
1170	1175	1180
Gly Ser Pro lieAsp Tyr Gly Val lieValAsp Thr Lys		
AlaTyr Ser		
1185	1190	1195
Gly Gly Tyr AsnLeu Pro lie Gly GinAlaAsp Glu Met		
GinArg Tyr		
1205	1210	1215
Val Glu Glu Asn Gin Thr Arg Asn Lys His lie Asn Pro Asn		
Glu Trp		
1220	1225	1230
Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu		
Phe Val		
1235	1240	1245
Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu Thr Arg		

Leu Asn
 1250 1255 1260
 His lie Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu
 Leu Leu 1265 1270 1275 1280
 lie Gly Gly Glu Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu
 Glu Val
 1285 1290 1295
 Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu lie Asn Phe
 1300 1305

<210> 53

<211> 1341

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 53

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
Trp Lys Asp 15 10 15
Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
Pro Arg Arg 20 25 30
Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
Arg Val 35 40 45
Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
Pro Leu
50 55 60
Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArg Leu Pro Ser
65 70 75 80
Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPhe Ser Asp Leu
85 90 95
Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
Asp Ser
100 105 110
Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
Glu Trp
115 120 125
Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
Pro Thr
130 135 140
Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArg AlaLys ProAla
145 150 155 160
Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAlaSer ProAla AlaGin

165	170	175
Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu		
Lys lie		
180	185	190
Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala		
Leu Val		
195	200	205
Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin		
His Pro		
210	215	220
Ala Ala LeuGlyThr Val AlaValThr Tyr GinHislie lie		
ThrAla		
225	230	235
Leu Pro GluAlaThr His GluAsplie Val GlyValGly Lys		
GinTrp		
245	250	255
Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly		
Glu Leu		
260	265	270
Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys		
lie Ala		
275	280	285
Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser		
Arg Asn		
290	295	300
Ala Leu ThrGlyAla Pro LeuAsnLeu Thr ProAlaGin Val		
ValAla		
305	310	315
lie Ala SerAsnlie Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val		
GinArg		
325	330	335
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp		
Gin Val		
340	345	350
Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu		

Thr Val
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin Val ValAlalialie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala
 LeuGlu
 385 390 395 400
 Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly
 LeuThr
 405 410 415
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys
 Gin Ala
 420 425 430
 Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly
 435 440 445
 Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly
 Gly Lys
 450 455 460
 Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys
 GinAsp
 465 470 475 480
 His Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala lieAlaAsn Asn
 AsnGly
 485 490 495
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 500 505 510
 Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
 Ser Asn
 515 520 525
 lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
 Pro Val
 530 535 540

Leu Cys	GinAspHis Gly	LeuThrPro Asp	GinValVal	Ala
	lieAla			
545	550	555	560	
Ser Asn	GlyGlyGly Lys	GinAlaLeu Glu	ThrValGin	Arg
	LeuLeu			
	565	570	575	
Pro Val	Leu Cys Gin Asp His Gly	Leu Thr	Pro Asp	Gin Val
Val Ala				
	580	585	590	
lie Ala	Ser Asn Gly Gly Gly Lys	Gin Ala	Leu Glu Thr	Val
Gin Arg				
	595	600	605	
Leu Leu	Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly	Leu Thr	Pro Asp	
Gin Val				
610	615	620		
Val Ala	lieAlaSer His	AspGlyGly Lys	GinAlaLeu	Glu
	ThrVal			
625	630	635	640	
Gin Arg	LeuLeuPro Val	LeuCysGin Asp	HisGlyLeu	Thr
	ProAsp			
	645	650	655	
Gin Val	Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys	Gin Ala		
Leu Glu				
	660	665	670	

Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly
 Leu Thr 675 680 685
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 Gin Ala
 690 695 700
 Leu Glu ThrValGinArgLeuLeuProValLeuCysGinAspHis Gly
 705 710 715 720
 Leu Thr ProAspGinValValAlalieAlaSerAsnGlyGlyGly Lys
 725 730 735
 Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 Gin Asp
 740 745 750
 His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn
 Gly Gly
 755 760 765
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 770 775 780
 Gin Asp HisGlyLeuThrProAspGinValValAlalieAlaSer His
 785 790 795 800
 Asp Gly GlyLysGinAlaLeuGluThrValGinArgLeuLeuPro Val
 805 810 815
 Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala
 lie Ala
 820 825 830
 Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg
 Leu Leu
 835 840 845
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 850 855 860
 lie Ala SerHisAspGlyGlyLysGinAlaLeuGluThrValGin Arg
 865 870 875 880
 Leu Leu ProValLeuCysGinAspHisGlyLeuThrProAspGin Val
 885 890 895

Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
Ser lie
900 905 910
Val Ala Gin Leu Ser Arg Arg Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu
Thr Asn
915 920 925
Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala
Leu Asp
930 935 940
Ala Val LysLysGlyLeuProHisAlaProGluPhe lie Arg Arg Val
945 950 955 960
Asn Arg Arg lie Ala Glu Arg Thr Ser His Arg Val Ala Asp Tyr Ala
965 970 975
His Val Val Arg Val Leu Glu Phe Phe Gin Cys His Ser His
Pro Ala
980 985 990
His Ala Phe Asp Glu Ala Met Thr Gin Phe Gly Met Ser Arg
His Gly
995 1000 1005
Leu Val Gin Leu Phe Arg Arg Val Gly Val Thr Glu Phe Glu
Ala Arg
1010 1015 1020
Tyr Gly Thr LeuPro Pro Ala Ser GinArgTrp Asp Arg
lieLeu Gin
1025 1030 1035 1040
Ala Ser Gly MetLys Arg Ala Lys ProSerPro Thr Ser
AlaGin Thr
1045 1050 1055
Pro Asp Gin Thr Ser Leu His Ala Phe Ala Asp Ser Leu Glu
Arg Asp
1060 1065 1070
Leu Asp Ala Pro Ser Pro Met His Glu Gly Asp Gin Thr Arg
Ala Ser
1075 1080 1085
Ser Arg Lys Arg Ser Arg Ser Asp Arg Ala Val Thr Gly Pro

Ser Ala
 1090 1095 1100
 Gin Gin Ala Val Glu Val Arg Val Pro Glu Gin Arg Asp Ala
 Leu His 1105 1110 1115 1120
 Leu Pro Leu Ser Trp Arg Val Lys Arg Pro Arg Thr Arg lie
 Trp Gly
 1125 1130 1135
 Gly Leu Pro Asp Pro lie Ser Arg Ser Gin Leu Val Lys Ser
 Glu Leu
 1140 1145 1150
 Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val
 Pro His
 1155 1160 1165
 Glu Tyr lie Glu Leu lie Glu lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin
 Asp Arg

1170	1175	1180
lie Leu Glu Met Lys	Val Met Glu	Phe Phe Met Lys Val
Tyr Gly Tyr		
1185	1190	1195
Arg Gly Lys His Leu	Gly Gly Ser	Arg Lys Pro Asp Gly
Ala lie Tyr		
1205	1210	1215
Thr Val Gly Ser Pro lie	Asp Tyr Gly Val lie	Val Asp Thr
Lys Ala		
1220	1225	1230
Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn	Leu Pro lie Gly	Gln Ala Asp Glu
Met Gln		
1235	1240	1245
Arg Tyr Val Glu Glu Asn	Gln Thr Arg Asn Lys	His lie Asn
Pro Asn		
1250	1255	1260
Glu Trp Trp Lys Val Tyr	Pro Ser Ser Val Thr	Glu Phe Lys
Phe Leu 1265	1270	1275
Phe Val Ser Gly His Phe	Lys Gly Asn Tyr Lys	Ala Gln Leu
Thr Arg		
1285	1290	1295
Leu Asn His lie Thr Asn	Cys Asn Gly Ala Val	Leu Ser Val
Glu Glu		
1300	1305	1310
Leu Leu lie Gly Gly Glu	Met lie Lys Ala Gly	Thr Leu Thr
Leu Glu		
1315	1320	1325
Glu Val Arg Arg Lys Phe	Asn Asn Gly Glu lie	Asn Phe
1330	1335	1340

<210> 54

<211> 1341

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 54

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
 Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
 Pro Arg Arg 20 25 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
 Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu
 50 55 60
 Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeuProSer
 65 70 75 80
 Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSerAspLeu
 85 90 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
 Asp Ser
 100 105 110
 Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 Glu Trp
 115 120 125
 Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
 145 150 155 160
 Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAlaAlaGin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro
 210 215 220

Ala AlaLeu GlyThr ValAla Val Thr TyrGln His lie lie ThrAla
225 230 235 240
Leu ProGluAla ThrHis Glu Asp lieValGly ValGly LysGlnTrp

	245		250		255	
Ser	Gly	Ala	Arg	Ala	Leu	Glu
				Ala	Leu	Leu
Thr	Asp	Ala	Gly			
Glu	Leu					
	260		265		270	
Arg	Gly	Pro	Pro	Leu	Gin	Leu
				Asp	Thr	Gly
Gin	Leu	Val	Lys			
lie	Ala					
	275		280		285	
Lys	Arg	Gly	Gly	Val	Thr	Ala
				Met	Glu	Ala
Val	His	Ala	Ser			
Arg	Asn					
	290		295		300	
Ala	Leu	Thr	Gly	Ala	Pro	Leu
				Asn	Leu	Thr
Pro	Ala	Gin	Val			
Val	Ala					
	305		310		315	
lie	Ala	Ser	Asn	lie	Gly	Gly
				Lys	Gin	Ala
Leu	Glu	Thr	Val			
Gin	Arg					
	325		330		335	
Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gin
				Asp	His	Gly
Leu	Thr	Pro	Asp			
Gin	Val					
	340		345		350	
Val	Ala	lie	Ala	Ser	His	Asp
				Gly	Gly	Lys
Gin	Ala	Leu	Glu			
Thr	Val					
	355		360		365	
Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu
				Cys	Gin	Asp
His	Gly	Leu	Thr			
Pro	Asp					
	370		375		380	
Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser
				Asn	Gly	Gly
Gly	Lys	Gin	Ala			
Leu	Glu					
	385		390		395	
Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro
				Val	Leu	Cys
Gin	Asp	His	Gly			
Leu	Thr					
	405		410		415	
Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala	lie
					Ala	Ser
His	Asp	Gly	Gly	Lys		
Gin	Ala					
	420		425		430	
Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg	Leu
				Leu	Pro	Val
Leu	Cys	Gin	Asp			

His Gly
 435 440 445
 Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly
 Gly Lys
 450 455 460
 Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys
 GinAsp
 465 470 475 480
 His Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala lieAlaSer Asn
 AsnGly
 485 490 495
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 500 505 510
 Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
 Ser His
 515 520 525
 Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
 Pro Val
 530 535 540
 Leu Cys GinAspHis Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala
 lieAla
 545 550 555 560
 Ser His AspGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
 LeuLeu
 565 570 575
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 580 585 590
 lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 595 600 605
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 610 615 620

Val	Ala	lie	Ala	Ser	Asn	Asn	Gly	Gly	Lys	Gin	Ala	Leu	Glu
	Thr	Val											
625					630				635				640
Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gin	Asp	His	Gly	Leu	Thr
	Pro	Asp											
					645				650				655
Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	Asn	lie	Gly	Gly	Lys	Gin	Ala
Leu	Glu												
					660				665				670
Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gin	Asp	His	Gly
Leu	Thr												
					675				680				685
Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	Asn	lie	Gly	Gly	Lys
Gin	Ala												
					690				695				700
Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys	Gin	Asp
705					710				715				720
Leu	Thr	Pro	Asp	Gin	Val	Val	Ala	lie	Ala	Ser	Asn	Asn	Gly
					725				730				735
Gin	Ala	Leu	Glu	Thr	Val	Gin	Arg	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Cys
Gin	Asp												
					740				745				750

His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His
 Asp Gly 755 760 765
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 770 775 780
 Gin Asp HisGlyLeuThrProAspGinValValAlaAlieAlaSer Asn
 785 790 795 800
 lie Gly GlyLysGinAlaLeuGluThrValGinArgLeuLeuPro Val
 805 810 815
 Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala
 lie Ala
 820 825 830
 Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg
 Leu Leu
 835 840 845
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 850 855 860
 lie Ala SerAsnlieGlyGlyLysGinAlaLeuGluThrValGin Arg
 865 870 875 880
 Leu Leu ProValLeuCysGinAspHisGlyLeuThrProAspGin Val
 885 890 895
 Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Ser lie
 900 905 910
 Val Ala Gin Leu Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu
 Thr Asn
 915 920 925
 Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala
 Met Asp
 930 935 940
 Ala Val LysLysGlyLeuProHisAlaProGluLeulieArgArg Val
 945 950 955 960
 Asn ArgArglieGlyGluArgThrSerHisArgValAlaAspTyrAla
 965 970 975

Gin Val Val Arg Val Leu Glu Phe Phe Gin Cys His Ser His
 Pro Ala
 980 985 990
 Tyr Ala Phe Asp Glu Ala Met Thr Gin Phe Gly Met Ser Arg
 Asn Gly
 995 1000 1005
 Leu Val Gin Leu Phe Arg Arg Val Gly Val Thr Glu Leu Glu
 Ala Arg
 1010 1015 1020
 Gly Gly Thr LeuPro Pro Ala Ser GinArgTrp Asp Arg
 lieLeu Gin
 1025 1030 1035 1040
 Ala Ser Gly MetLys Arg Ala Lys ProSerPro Thr Ser
 AlaGin Thr
 1045 1050 1055
 Pro Asp Gin Ala Ser Leu His Ala Phe Ala Asp Ser Leu Glu
 Arg Asp
 1060 1065 1070
 Leu Asp Ala Pro Ser Pro Met His Glu Gly Asp Gin Thr Arg
 Ala Ser
 1075 1080 1085
 Ser Arg Lys Arg Ser Arg Ser Asp Arg Ala Val Thr Gly Pro
 Ser Ala
 1090 1095 1100
 Gin Gin Ala Val Glu Val Arg Val Pro Glu Gin Arg Asp Ala
 Leu His 1105 1110 1115 1120
 Leu Pro Leu Ser Trp Arg Val Lys Arg Pro Arg Thr Arg lie
 Trp Gly
 1125 1130 1135
 Gly Leu Pro Asp Pro lie Ser Arg Ser Gin Leu Val Lys Ser
 Glu Leu
 1140 1145 1150
 Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val
 Pro His
 1155 1160 1165

Glu Tyr lie Glu Leu lie Glu lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin
 Asp Arg
 1170 1175 1180
 lie Leu Glu MetLys Val Met Glu PhePheMet Lys Val
 TyrGly Tyr
 1185 1190 1195 1200
 Arg Gly Lys HisLeu Gly Gly Ser ArgLysPro Asp Gly
 Ala lie Tyr
 1205 1210 1215
 Thr Val Gly Ser Pro lie Asp Tyr Gly Val lie Val Asp Thr
 Lys Ala
 1220 1225 1230
 Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro lie Gly Gin Ala Asp Glu
 Met Gin
 1235 1240 1245
 Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gin Thr Arg Asn Lys His lie Asn
 Pro Asn

1250	1255	1260
Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys		
Phe Leu 1265	1270	1275 1280
Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu		
Thr Arg		
	1285	1290 1295
Leu Asn His lie Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val		
Glu Glu		
	1300	1305 1310
Leu Leu lie Gly Gly Glu Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr		
Leu Glu		
	1315	1320 1325
Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu lie Asn Phe		
1330	1335	1340

<210> 55

<211> 1341

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 55

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
 Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
 Pro Arg Arg 20 25 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
 Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu
 50 55 60
 Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeuProSer
 65 70 75 80
 Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSerAspLeu
 85 90 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
 Asp Ser
 100 105 110
 Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 Glu Trp
 115 120 125
 Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
 145 150 155 160
 Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAlaAlaGin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro
 210 215 220

Ala AlaLeuGlyThrValAlaValThrTyrGinHislie lie ThrAla
 225 230 235 240
 Leu ProGluAlaThrHisGluAsplieValGlyValGlyLysGinTrp
 245 250 255
 Ser GlyAlaArgAlaLeuGluAlaLeuLeuThrAspAlaGly
 GluLeu
 260 265 270
 ArgGlyProProLeuGinLeuAspThrGlyGinLeuValLys
 lieAla
 275 280 285
 LysArgGlyGlyValThrAlaMetGluAlaValHisAlaSer
 ArgAsn
 290 295 300
 AlaLeuThrGlyAlaProLeuAsnLeuThrProAlaGinValValAla
 305 310 315 320
 lieAlaSerAsnAsnGlyGlyLysGinAlaLeuGluThrValGinArg

325	330	335	
Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp			
Gin Val			
340	345	350	
Val Ala lie Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu			
Thr Val			
355	360	365	
Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr			
Pro Asp			
370	375	380	
Gin Val ValAlaAlaAla SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala			
LeuGlu			
385	390	395	400
Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly			
LeuThr			
405	410	415	
Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys			
Gin Ala			
420	425	430	
Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp			
His Gly			
435	440	445	
Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly			
Gly Lys			
450	455	460	
Gin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys			
GinAsp			
465	470	475	480
His Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala lieAlaSer Asn			
lieGly			
485	490	495	
Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val			
Leu Cys			
500	505	510	
Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala			

Ser His
 515 520 525
 Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
 Pro Val
 530 535 540
 Leu Cys GinAspHis Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala
 lieAla
 545 550 555 560
 Ser His AspGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
 LeuLeu
 565 570 575
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 580 585 590
 lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 595 600 605
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 610 615 620
 Val Ala lieAlaSer Asn lieGlyGly Lys GinAlaLeu Glu
 ThrVal
 625 630 635 640
 Gin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Asp HisGlyLeu Thr
 ProAsp
 645 650 655
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala
 Leu Glu
 660 665 670
 Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly
 Leu Thr
 675 680 685
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys
 Gin Ala
 690 695 700

Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg
 Leu Leu 835 840 845
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 850 855 860
 lie Ala SerHisAspGlyGlyLysGinAlaLeuGluThrValGin Arg
 865 870 875 880
 Leu Leu ProValLeuCysGinAspHisGlyLeuThrProAspGin Val
 885 890 895
 Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Ser lie
 900 905 910
 Val Ala Gin Leu Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu
 Thr Asn
 915 920 925
 Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala
 Met Asp
 930 935 940
 Ala Val LysLysGlyLeuProHisAlaProGluLeulieArgArg Val
 945 950 955 960
 Asn ArgArglieGlyGluArgThrSerHisArgValAlaAspTyrAla
 965 970 975
 Gin Val Val Arg Val Leu Glu Phe Phe Gin Cys His Ser His
 Pro Ala
 980 985 990
 Tyr Ala Phe Asp Glu Ala Met Thr Gin Phe Gly Met Ser Arg
 Asn Gly
 995 1000 1005
 Leu Val Gin Leu Phe Arg Arg Val Gly Val Thr Glu Leu Glu
 Ala Arg
 1010 1015 1020
 Gly Gly Thr LeuPro Pro Ala Ser GinArgTrp Asp Arg
 lieLeu Gin
 1025 1030 1035 1040
 Ala Ser Gly MetLys Arg Ala Lys ProSerPro Thr Ser

AlaGin Thr															
1045				1050				1055							
Pro	Asp	Gin	Ala	Ser	Leu	His	Ala	Phe	Ala	Asp	Ser	Leu	Glu		
Arg	Asp														
1060				1065				1070							
Leu	Asp	Ala	Pro	Ser	Pro	Met	His	Glu	Gly	Asp	Gin	Thr	Arg		
Ala	Ser														
1075				1080				1085							
Ser	Arg	Lys	Arg	Ser	Arg	Ser	Asp	Arg	Ala	Val	Thr	Gly	Pro		
Ser	Ala														
1090				1095				1100							
Gin	Gin	Ala	Val	Glu	Val	Arg	Val	Pro	Glu	Gin	Arg	Asp	Ala		
Leu	His	1105	1110	1115				1120							
Leu	Pro	Leu	Ser	Trp	Arg	Val	Lys	Arg	Pro	Arg	Thr	Arg	lie		
Trp	Gly														
1125				1130				1135							
Gly	Leu	Pro	Asp	Pro	lie	Ser	Arg	Ser	Gin	Leu	Val	Lys	Ser		
Glu	Leu														
1140				1145				1150							
Glu	Glu	Lys	Lys	Ser	Glu	Leu	Arg	His	Lys	Leu	Lys	Tyr	Val		
Pro	His														
1155				1160				1165							
Glu	Tyr	lie	Glu	Leu	lie	Glu	lie	Ala	Arg	Asn	Ser	Thr	Gin		
Asp	Arg														
1170				1175				1180							
lie	Leu	Glu	Met	Lys	Val	Met	Glu	Phe	Phe	Met	Lys	Val			
TyrGly Tyr															
1185				1190				1195				1200			
Arg	Gly	Lys	His	Leu	Gly	Gly	Ser	Arg	Lys	Pro	Asp	Gly			
Ala				lie Tyr											
1205				1210				1215							
Thr	Val	Gly	Ser	Pro	lie	Asp	Tyr	Gly	Val	lie	Val	Asp	Thr		
Lys	Ala														
1220				1225				1230							
Tyr	Ser	Gly	Gly	Tyr	Asn	Leu	Pro	lie	Gly	Gin	Ala	Asp	Glu		

Met Gin

1235

1240

1245

Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gin Thr Arg Asn Lys His lie Asn
Pro Asn

1250

1255

1260

Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys
Phe Leu 1265 1270 1275 1280
Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu
Thr Arg

1285

1290

1295

Leu Asn His lie Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val
Glu Glu

1300

1305

1310

Leu Leu lie Gly Gly Glu Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr
Leu Glu

1315

1320

1325

Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu lie Asn Phe

1330

1335

1340

<210> 56

<211> 51

<212> DNA

<213> Arabidopsis

<400> 56

tatcaagatt ctcttcactt ctctctgtca caccgatgtt tacttctggg a 51

<210> 57

<211> 50

<212> DNA

<213> Arabidopsis

<400> 57

tccggatgct cctcttgaca aggtctgtat tgtcagttgt ggtttgtcta 50

<210> 58

<211> 48

<212> DNA

<213> Arabidopsis

<400> 58

cggatgctc ctcttgacaa ggtctgtatt gtcagttgtg gtttgtct 48

<210> 59

<211> 40

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> modifiye Arabidopsis

<400> 59

ccggatgctc ctcttgacaa ttgtcagttg tggtttgtct 40

<210> 60

<211> 43

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> modifiye Arabidopsis

<400> 60

ccggatgctc ctcttgacaa gtattgtcag ttgtggtttg tct 43

<210> 61

<211> 33

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> modifiye Arabidopsis

<400> 61

ccggatgctc ctcttgacaa ttgtggtttg tct 33

<210> 62

<211> 43

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> modifiye Arabidopsis

<400> 62

ccggatgctc ctcttgacaa ggattgtcag ttgtggtttg tct 43

<210> 63

<211> 41

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> modifiye Arabidopsis

<400> 63

ccggatgctc ctcttgacaa attgtcagtt gtggtttgtc t 41

<210> 64

<211> 44

<212> DNA

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> modifiye Arabidopsis

<400> 64

cgggatgctc ctcttgacaa ggtattgtca gttgtgggtt gtct 44

<210> 65

<211> 34

<212> PRT

<213> Xanthomonas gardneri

<400> 65

Leu	Asp	Thr	Gly	Gln	Leu	Phe	Lys	Ile	Ala	Lys	Arg	Gly	Gly
Val	Thr	15					10				15		

Ala	Val	Glu	Ala	Val	His	Ala	Trp	Arg	Asn	Ala	Leu	Thr	Gly
			Ala	Pro	20		25				30		

Leu Asn

<210> 66

<211> 34

<212> PRT

<213> Xanthomonas campestris

<400> 66

Leu Asp Thr Gly Gin Leu Leu Lys lie Ala Lys Arg Gly
 Gly Val Thr 15 10 15

Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu Thr Gly
 Ala Pro 20 25 30

Leu Asn

<210> 67

<211> 34

<212> PRT

<213> *Xanthomonas oryzae*

<400> 67

Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys lie Ala Lys Arg Gly Gly
 Val Thr

15 10 15

Ala Val Glu Ala Val His Ala Ser Arg Asn Ala Leu Thr Gly
 Ala Pro

20 25 30

Leu Asn

<210> 68

<211> 34

<212> PRT

<213> Xanthomonas citri

<400> 68

Leu Asp Thr Gly Gin Leu Leu Lys lie Ala Lys Arg Gly Gly
Val Thr 15 10 15

Ala Val Glu Ala Val His Ala Trp Arg Asn Ala Leu Thr Gly
Ala Pro 20 25 30

Leu Asn

<210> 69

<211> 34

<212> PRT

<213> Xanthomonas oryzae

<400> 69

Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys lie Ala Lys Arg Gly Gly
Val Thr 15 10 15

Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser Arg Asn Ala Leu Thr Gly
Ala Pro 20 25 30

Leu Asn

<210> 70

<211> 34

<212> PRT

<213> Xanthomonas oryzae

<400> 70

Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys lie Ala Lys Arg Gly
 Gly Val Thr 15 10 15

Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser Arg Asn Ala Leu Thr Gly
 Ala Pro 20 25 30

Leu Asn

<210> 71

<211> 34

<212> PRT

<213> Xanthomonas oryzae

<400> 71

Leu Thr Pro Ala Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Asn Gly
 Gly Lys 15 10 15

Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 Gin Ala 20 25 30

His Gly

<210> 72

<211> 1307

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 72

Met Ala Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ser
 Trp Lys Asp 15 10 15
 Ala Ser Gly Trp Ser Arg Met His Ala Asp Pro lie Arg
 Pro Arg Arg 20 25 30
 Pro Ser Pro Ala Arg Glu Leu Leu Pro Gly Pro Gin Pro Asp
 Arg Val 35 40 45
 Gin Pro Thr Ala Asp Arg Gly Val Ser Ala Pro Ala Gly Ser
 Pro Leu
 50 55 60
 Asp GlyLeuProAlaArgArgThrValSerArg ThrArgLeuProSer
 65 70 75 80
 Pro ProAlaProSerProAlaPheSerAlaGly SerPheSerAspLeu
 85 90 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser Leu Leu
 Asp Ser
 100 105 110
 Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 Glu Trp
 115 120 125
 Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Val ArgValAlaValThrAlaAlaArgProProArgAlaLysProAla
 145 150 155 160
 Pro ArgArgArgAlaAlaGinProSerAspAla SerProAlaAlaGin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro
 210 215 220

Ala AlaLeu Gly Thr Val Ala Val Thr TyrGin His lie lie ThrAla
 225 230 235 240
 Leu ProGluAla Thr His Glu Asp lieValGly ValGly Lys GinTrp
 245 250 255
 Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly
 Glu Leu
 260 265 270
 Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys
 lie Ala
 275 280 285
 Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
 Arg Asn
 290 295 300
 Ala LeuThr GlyAla ProLeuAsnLeu ThrPro Ala GinValValAla
 305 310 315 320
 lie AlaSerAsnAsnGlyGlyLysGinAlaLeu Glu ThrValGinArg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 340 345 350
 Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin ValValAla lieAlaSerAsn lieGlyGly LysGinAlaLeuGlu
 385 390 395 400
 Thr ValGinArgLeuLeuProValLeuCysGin AspHisGlyLeuThr
 405 410 415
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
 Gin Ala
 420 425 430
 Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly

435 440 445
Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn lie Gly
Gly Lys
450 455 460
Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
Gin Asp

465 470 475 480
 His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His
 Asp Gly
 485 490 495
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 500 505 510
 Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala
 Ser His
 515 520 525
 Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu
 Pro Val
 530 535 540
 Leu Cys GinAspHis Gly LeuThrPro Asp GinValVal Ala
 lieAla
 545 550 555 560
 Ser Asn GlyGlyGly Lys GinAlaLeu Glu ThrValGin Arg
 LeuLeu
 565 570 575
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 580 585 590
 lie Ala Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val
 Gin Arg
 595 600 605
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 610 615 620
 Val Ala lieAlaSer Asn lieGlyGly Lys GinAlaLeu Glu
 ThrVal
 625 630 635 640
 Gin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Asp HisGlyLeu Thr
 ProAsp
 645 650 655
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gin Ala

Leu Glu
 660 665 670
 Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly
 Leu Thr
 675 680 685
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys
 Gin Ala
 690 695 700
 Leu Glu ThrValGin Arg LeuLeuPro Val LeuCysGin Asp
 HisGly
 705 710 715 720
 Leu Thr ProAspGin Val ValAlalie Ala SerAsnlie Gly
 GlyLys
 725 730 735
 Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 Gin Asp
 740 745 750
 His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn
 Gly Gly
 755 760 765
 Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val
 Leu Cys
 770 775 780
 Gin Asp HisGlyLeu Thr ProAspGin Val ValAlalie Ala
 SerAsn
 785 790 795 800
 Gly Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu
 ProVal
 805 810 815
 Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala
 lie Ala
 820 825 830
 Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg
 Leu Leu
 835 840 845

Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 850 855 860
 lie Ala SerAsnGly Gly GlyLysGin Ala LeuGluSer lie
 ValAla
 865 870 875 880
 Gin Leu SerArgPro Asp ProAlaLeu Ala AlaLeuThr Asn
 AspHis
 885 890 895
 Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Met Asp
 Ala Val
 900 905 910
 Lys Lys Gly Leu Pro His Ala Pro Glu Leu lie Arg Arg Val
 Asn Arg
 915 920 925
 Arg lie Gly Glu Arg Thr Ser His Arg Val Ala Asp Tyr Ala
 Gin Val
 930 935 940
 Val ArgValLeuGluPhe Phe GinCysHis Ser HisProAla Tyr
 Ala
 945 950 955 960
 Phe Asp GluAlaMet Thr GinPheGly Met SerArgAsn Gly
 LeuVal
 965 970 975

Gin Leu Phe Arg Arg Val Gly Val Thr Glu Leu Glu Ala
 Arg Gly Gly 980 985 990
 Thr Leu Pro Pro Ala Ser Gin Arg Trp Asp Arg lie Leu Gin
 Ala Ser 995 1000 1005
 Gly Met Lys Arg Ala Lys Pro Ser Pro Thr Ser Ala Gin Thr
 Pro Asp
 1010 1015 1020
 Gin Ala Ser Leu His Ala Phe Ala Asp Ser Leu Glu Arg Asp
 Leu Asp 1025 1030 1035 1040
 Ala Pro Ser Pro Met His Glu Gly Asp Gin Thr Arg Ala Ser
 Ser Arg
 1045 1050 1055
 Lys Arg Ser Arg Ser Asp Arg Ala Val Thr Gly Pro Ser Ala
 Gin Gin
 1060 1065 1070
 Ala Val Glu Val Arg Val Pro Glu Gin Arg Asp Ala Leu His
 Leu Pro
 1075 1080 1085
 Leu Ser Trp Arg Val Lys Arg Pro Arg Thr Arg lie Trp Gly
 Gly Leu
 1090 1095 1100
 Pro Asp Pro lieSer Arg Ser Gin LeuValLys Ser Glu
 LeuGlu Glu
 1105 1110 1115 1120
 Lys Lys Ser GluLeu Arg His Lys LeuLysTyr Val Pro
 HisGlu Tyr
 1125 1130 1135
 lie Glu Leu lie Glu lie Ala Arg Asn Ser Thr Gin Asp Arg
 lie Leu
 1140 1145 1150
 Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr
 Arg Gly
 1155 1160 1165
 Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala lie Tyr
 Thr Val

1170	1175	1180
Gly Ser Pro lie Asp Tyr Gly Val lie Val Asp Thr Lys		
Ala Tyr Ser		
1185	1190	1195
Gly Gly Tyr Asn Leu Pro lie Gly Gin Ala Asp Glu Met		1200
Gin Arg Tyr		
1205	1210	1215
Val Glu Glu Asn Gin Thr Arg Asn Lys His lie Asn Pro Asn		
Glu Trp		
1220	1225	1230
Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu		
Phe Val		
1235	1240	1245
Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gin Leu Thr Arg		
Leu Asn		
1250	1255	1260
His lie Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu Ser Val Glu Glu		
Leu Leu 1265	1270	1275
lie Gly Gly Glu Met lie Lys Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu		1280
Glu Val		
1285	1290	1295
Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu lie Asn Phe		
1300	1305	

<210> 73

<211> 1409

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 73

Met	Ala	Ser	Ser	Pro	Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Ser
Trp	Lys	Asp	15				10				15	
Ala	Ser	Gly	Trp	Ser	Arg	Met	His	Ala	Asp	Pro	lie	Arg
				Pro	Arg	Arg	20	25			30	
Pro	Ser	Pro	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Pro	Gly	Pro	Gin	Pro
		Asp	Arg	Val	35	40				45		
Gin	Pro	Thr	Ala	Asp	Arg	Gly	Val	Ser	Ala	Pro	Ala	Gly
		Ser	Pro	Leu	50	55				60		
Asp	Gly	Leu	Pro	Ala	Arg	Arg	Thr	Val	Ser	Arg	Thr	Arg
Leu	Pro	Ser	65	70				75			80	

Pro Pro Ala Pro Ser Pro Ala Phe Ser Ala Gly Ser
 Phe Ser Asp Leu 85 90
 95
 Leu Arg Pro Phe Asp Pro Ser Leu Leu Asp Thr Ser
 Leu Leu Asp Ser 100 105
 110
 Met Pro Ala Val Gly Thr Pro His Thr Ala Ala Ala Pro Ala
 Glu Trp 115 120 125
 Asp Glu Ala Gin Ser Ala Leu Arg Ala Ala Asp Asp Pro Pro
 Pro Thr
 130 135 140
 Val ArgValAlaValThr Ala AlaArgPro Pro ArgAlaLys Pro
 Ala
 145 150 155 160
 Pro Arg ArgArgAla Ala GinProSer Asp AlaSerPro Ala
 AlaGin
 165 170 175
 Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gin Gin Gin Gin Glu
 Lys lie
 180 185 190
 Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gin His His Glu Ala
 Leu Val
 195 200 205
 Gly His Gly Phe Thr His Ala His lie Val Ala Leu Ser Gin
 His Pro
 210 215 220
 Ala Ala LeuGlyThr Val AlaValThr Tyr GinHislie lie
 ThrAla
 225 230 235 240
 Leu Pro GluAlaThr His GluAsplie Val GlyValGly Lys
 GinTrp
 245 250 255
 Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly
 Glu Leu
 260 265 270

Arg Gly Pro Pro Leu Gin Leu Asp Thr Gly Gin Leu Val Lys
 lie Ala
 275 280 285
 Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
 Arg Asn
 290 295 300
 Ala Leu ThrGlyAla Pro LeuAsnLeu Thr ProAlaGin Val
 ValAla
 305 310 315 320
 lie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val
 GinArg
 325 330 335
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 Gin Val
 340 345 350
 Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 355 360 365
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 370 375 380
 Gin Val ValAlaAlie Ala SerAsnlie Gly GlyLysGin Ala
 LeuGlu
 385 390 395 400
 Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly
 LeuThr
 405 410 415
 Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys
 Gin Ala
 420 425 430
 Leu Glu Thr Val Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp
 His Gly
 435 440 445
 Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala lie Ala Ser Asn Asn Gly
 Gly Lys

[illegible]

580	585	590
lie Ala Ser Asn	lie Gly Gly Lys Gin	Ala Leu Glu Thr Val
Gin Arg		
595	600	605
Leu Leu Pro Val	Leu Cys Gin Asp His	Gly Leu Thr Pro Asp
Gin Val		
610	615	620
Val Ala	lieAlaSer Asn	lieGlyGly Lys
		GinAlaLeu Glu
	ThrVal	
625	630	635
Gin Arg	LeuLeuPro Val	LeuCysGin Asp
		HisGlyLeu Thr
	ProAsp	
	645	650
		655
Gin Val Val Ala	lie Ala Ser Asn	Gly Gly Gly Lys
Leu Glu		Gin Ala
	660	665
		670
Thr Val Gin Arg	Leu Leu Pro Val	Leu Cys Gin Asp His
Leu Thr		Gly
	675	680
		685
Pro Asp Gin Val	Val Ala lie Ala Ser Asn	lie Gly Gly Lys
Gin Ala		
690	695	700
Leu Glu	ThrValGin Arg	LeuLeuPro Val
		LeuCysGin Asp
	HisGly	
705	710	715
		720
Leu Thr	ProAspGin Val	ValAlaAlie Ala
		SerAsnlie Gly
	GlyLys	
	725	730
		735
Gin Ala Leu Glu Thr	Val Gin Arg Leu Leu	Pro Val Leu Cys
Gin Asp		
	740	745
		750
His Gly Leu Thr Pro	Asp Gin Val Val Ala	lie Ala Ser Asn
lie Gly		
	755	760
		765
Gly Lys Gin Ala Leu	Glu Thr Val Gin Arg	Leu Leu Pro Val

Leu Cys
 770 775 780
 Gin Asp HisGlyLeu Thr ProAspGin Val ValAlalie Ala
 SerHis
 785 790 795 800
 Asp Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val GinArgLeu Leu
 ProVal
 805 810 815
 Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val Val Ala
 lie Ala
 820 825 830
 Ser Asn lie Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu Thr Val Gin Arg
 Leu Leu
 835 840 845
 Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gin Val
 Val Ala
 850 855 860
 lie Ala SerHisAsp Gly GlyLysGin Ala LeuGluThr Val
 GinArg
 865 870 875 880
 Leu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly LeuThrPro Asp
 GinVal
 885 890 895
 Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala Leu Glu
 Thr Val
 900 905 910
 Gin Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gin Asp His Gly Leu Thr
 Pro Asp
 915 920 925
 Gin Val Val Ala lie Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gin Ala
 Leu Glu
 930 935 940
 Thr Val GinArgLeu Leu ProValLeu Cys GinAspHis Gly
 LeuThr
 945 950 955 960

Pro Asp	GinValVal Ala	lieAlaSer Asn	GlyGlyGly	Lys
	GinAla			
	965	970	975	
Leu Glu Ser lie Val Ala Gin Leu Ser Arg Pro Asp Pro Ala				
Leu Ala				
	980	985	990	
Ala Leu Thr Asn Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly				
Gly Arg				
	995	1000	1005	
Pro Ala Met Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Pro His Ala Pro				
Glu Leu				
	1010	1015	1020	
lie Arg Arg Val Asn Arg Arg lie Gly Glu Arg Thr Ser His				
Arg Val 1025	1030	1035	1040	
Ala Asp Tyr Ala Gin Val Val Arg Val Leu Glu Phe Phe Gin				
Cys His				
	1045	1050	1055	
Ser His Pro Ala Tyr Ala Phe Asp Glu Ala Met Thr Gin Phe				
Gly Met				
	1060	1065	1070	
Ser Arg Asn Gly Leu Val Gin Leu Phe Arg Arg Val Gly Val				
Thr Glu				
	1075	1080	1085	

Leu Glu Ala Arg Gly Gly Thr Leu Pro Pro Ala Ser Gin Arg
Trp Asp

1090 1095 1100
Arg lie Leu GinAla Ser Gly Met LysArgAla Lys Pro
SerPro Thr

1105 1110 1115 1120
Ser Ala Gin ThrPro Asp Gin Ala SerLeuHis Ala Phe
AlaAsp Ser

1125 1130 1135
Leu Glu Arg Asp Leu Asp Ala Pro Ser Pro Met His Glu Gly
Asp Gin

1140 1145 1150
Thr Arg Ala Ser Ser Arg Lys Arg Ser Arg Ser Asp Arg Ala
Val Thr

1155 1160 1165
Gly Pro Ser Ala Gin Gin Ala Val Glu Val Arg Val Pro Glu
Gin Arg

1170 1175 1180
Asp Ala Leu HisLeu Pro Leu Ser TrpArgVal Lys Arg
ProArg Thr

1185 1190 1195 1200
Arg lie Trp GlyGly Leu Pro Asp Pro lieSer Arg Ser
GinLeu Val

1205 1210 1215
Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys
Leu Lys

1220 1225 1230
Tyr Val Pro His Glu Tyr lie Glu Leu lie Glu lie Ala Arg
Asn Ser

1235 1240 1245
Thr Gin Asp Arg lie Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe
Met Lys

1250 1255 1260
Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys

Pro Asp 1265 1270 1275 1280
 Gly Ala lie Tyr Thr Val Gly Ser Pro lie Asp Tyr Gly Val
 lie Val
 1285 1290 1295
 Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro lie Gly
 Gin Ala
 1300 1305 1310
 Asp Glu Met Gin Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gin Thr Arg Asn
 Lys His
 1315 1320 1325
 lie Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val
 Thr Glu
 1330 1335 1340
 Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr
 Lys Ala 1345 1350 1355 1360
 Gin Leu Thr Arg Leu Asn His lie Thr Asn Cys Asn Gly Ala
 Val Leu
 1365 1370 1375
 Ser Val Glu Glu Leu Leu lie Gly Gly Glu Met lie Lys Ala
 Gly Thr
 1380 1385 1390
 Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu
 lie Asn
 1395 1400 1405
 Phe

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 74

Lys lie Ala Lys Arg Gly
Gly Val 1 5

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 75

Lys lie Ala Asn Gly Gly
Gly Val 1 5

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 76

Lys lie Ala Asn lie Gly
Gly Val 1 5

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 77

Lys lie Ala His Asp Gly
Gly Val 1 5

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 78

Lys lie Ala Asn Asn Gly
Gly Val 1 5

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 79

Lys lie Ala Lys Arg Gly
Gly Val 1 5

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 80

Lys lie Ala Ser Asn Gly Gly
Gly Val 1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 81

Lys lie Ala Ser Asn lie Gly
Gly Val 1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 82

Lys lie Ala Ser His Asp Gly
Gly Val 1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 83

Lys lie Ala Ser Asn Asn Gly
Gly Val 1 5

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 84

Lys lie Ala Lys Arg Gly
Gly Val 1 5

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 85

Lys lie Ala Lys Asn Gly Gly
Gly Val 1 5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 86

Lys lie Ala Lys Asn lie Gly
Gly Val 1 5

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 87

Lys lie Ala Lys His Asp Gly
Gly Val 1 5

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 88

Lys lie Ala Lys Asn Asn Gly
Gly Val 1 5

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 89

Lys lie Ala Lys Arg Gly
Gly Val 1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 90

Lys lie Ala Ser Asn Gly Gly
Gly Lys 1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 91

Lys lie Ala Ser Asn lie Gly
Gly Lys 1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay Dizi

<220>

<223> sentetik

<400> 92

Lys lie Ala Ser His Asp Gly
Gly Lys 1 5

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Yapay

Dizi <220>

<223>

sentet

ik

<400>

93

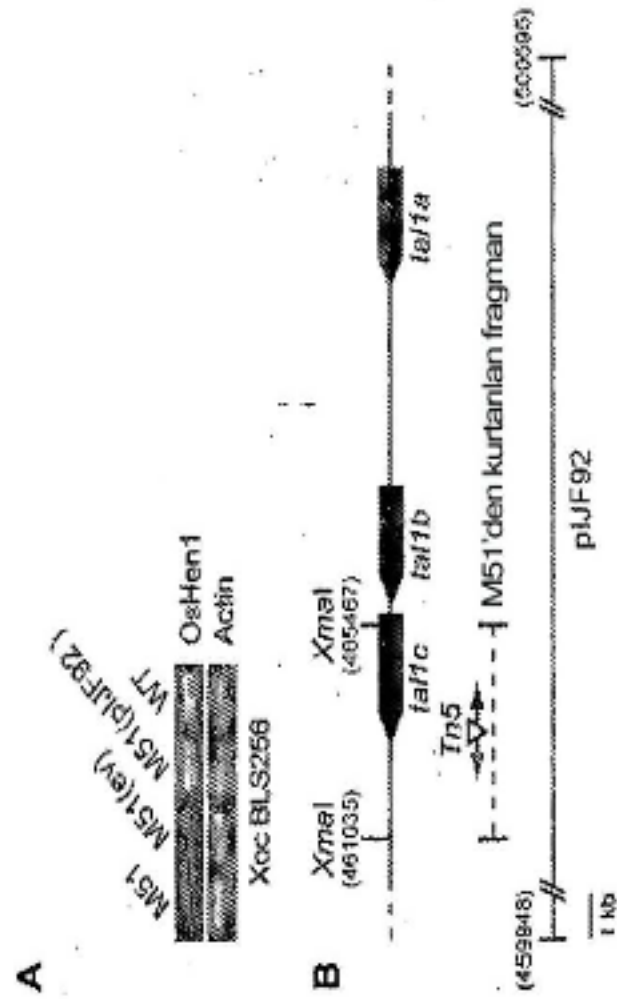
Lys lie Ala Ser Asn Asn Gly

Gly Lys 1 5

Şekil 1



Şekil 2



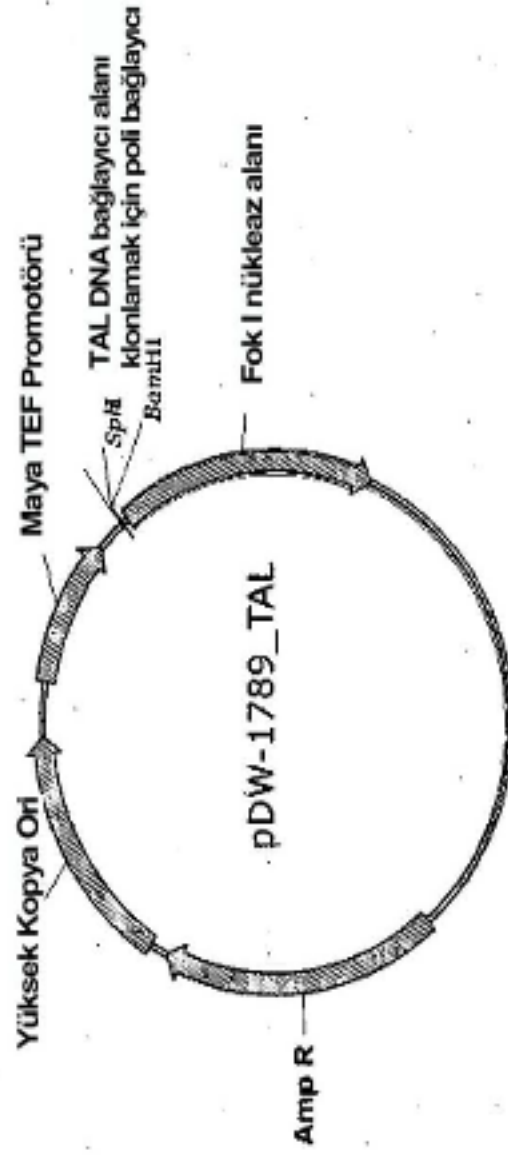
Şekil 3

MDPRSRTPSPARELLPGPOPDGVQPTADRGVSPFAGGDLGLPARRTMSRTRLPSPPAPSPAFSAGSFSDLRQDFPSLFNHSI
 FDSLPPFGAHHTEAATCEWDEVQSGLRPAQAPPTNIRVAVTAARPPRAKPAKPRRAAOFSDASPAQVDRTLGYSQOQOQEKI
 KPKYRSTVAQHHEALVGHGFTHAHVALSQHPAALGTVAVKYQDIMAALEPEATHEAIVGVKQWISGARALEALLTVAGELRGPPPL
 QLDYGOLLKWKRGVGTAVEAVHAWRNALTGAPLNLTPQOVVAIASHDGKKOALETVORLLPVLCQAHGLTPQOVVAIASNGGGK
 QALETVORLLPVLCQAHGLTPQOVVAIASNGGGKQALETVORLLPVLCQAHGLTPQOVVAIASNGGGKQALETVORLLPVLCQAH
 GLTPQOVVAIASNGGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQOVVAIASNGGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQOVVAIASNGGGKQAL
 LETVQALLPVLCQAHGLTPQOVVAIASHDGKKOALETVORLLPVLCQAHGLTPQOVVAIASHDGKKQALETVORLLPVLCQAHGLT
 PQOVVAIASNGGGKQALETVORLLPVLCQAHGLTPQOVVAIASNGGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQOVVAIASNGGGKQAL
 ETVORLLPVLCQAHGLTPQOVVAIASHDGKKQALETVORLLPVLCQAHGLTPQOVVAIASHDGKKQALETVORLLPVLCQAHGLT
 PQOVVAIASHDGKKQALETVORLLPVLCQAHGLTPQOVVAIASNGGGKQALETVORLLPVLCQAHGLTPQOVVAIASHDGKKQAL
 ETVORLLPVLCQAHGLTPQOVVAIASNGGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPQOVVAIASHDGKKQALETVORLLPVLCQAHGLT
 RRIPERTSHRVADHAQVVRVLGFFQCHSHPAQAFDDAMTOFGMSRHGLQLFRFVGVTELEARSGLTPPASQORWDRLOASGM
 KRAKPSPTSTOTPDQASLHAFADSLERDLDAPSPMHEGDOTRASSRKRSRSDRAVTPGPSAQQSFEVNRPEQORDALHPLSWRV
 KRPRTSIGGGGLPDGTPGTPAANDLAASSTVMREQDEDFAGAADOFFAFNEEELAWLMELLPO (SEQ ID NO:12)

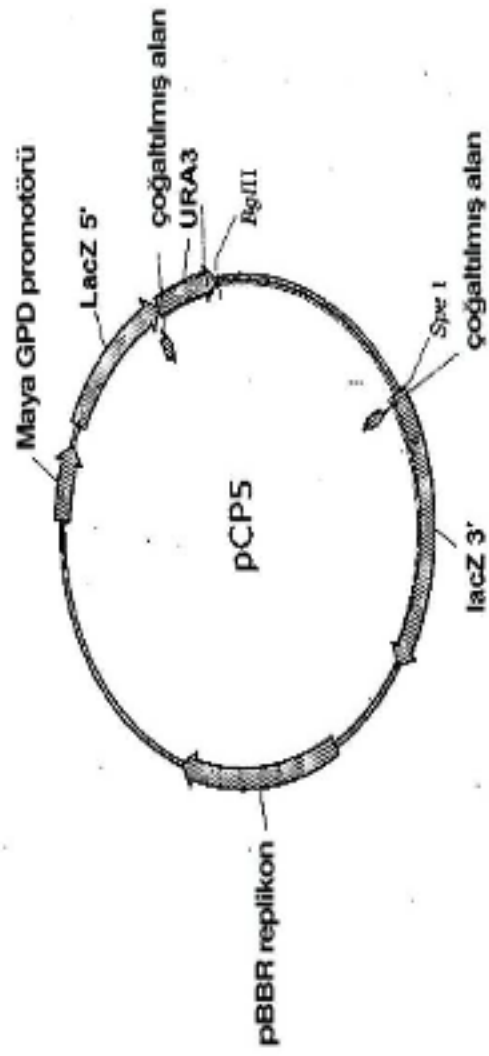
Sekil 4

[illegible]

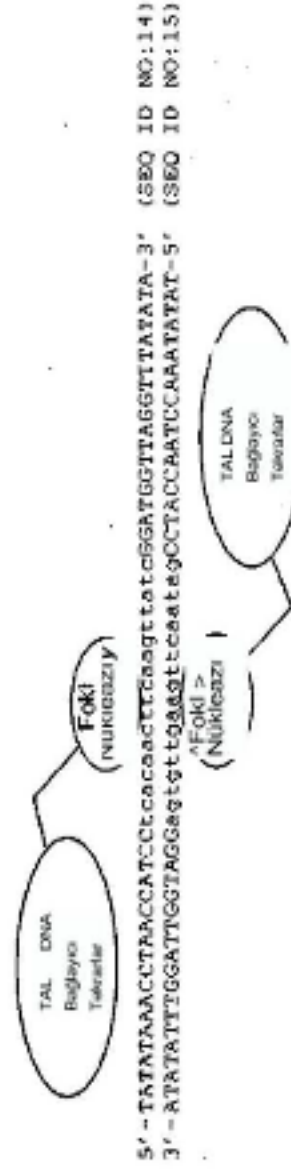
Şekil 5



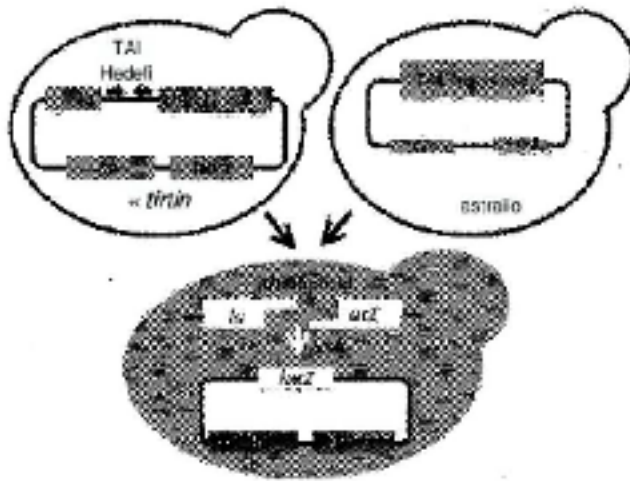
Şekil 6



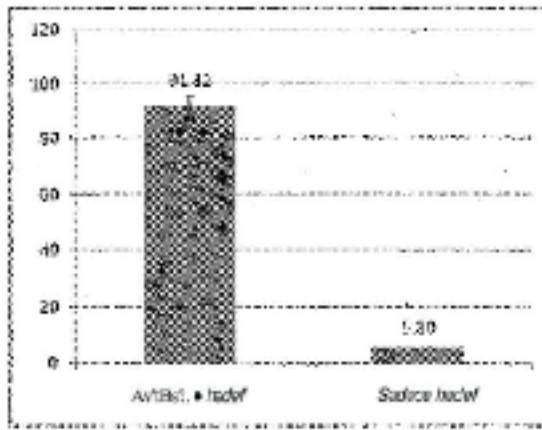
Şekil 7



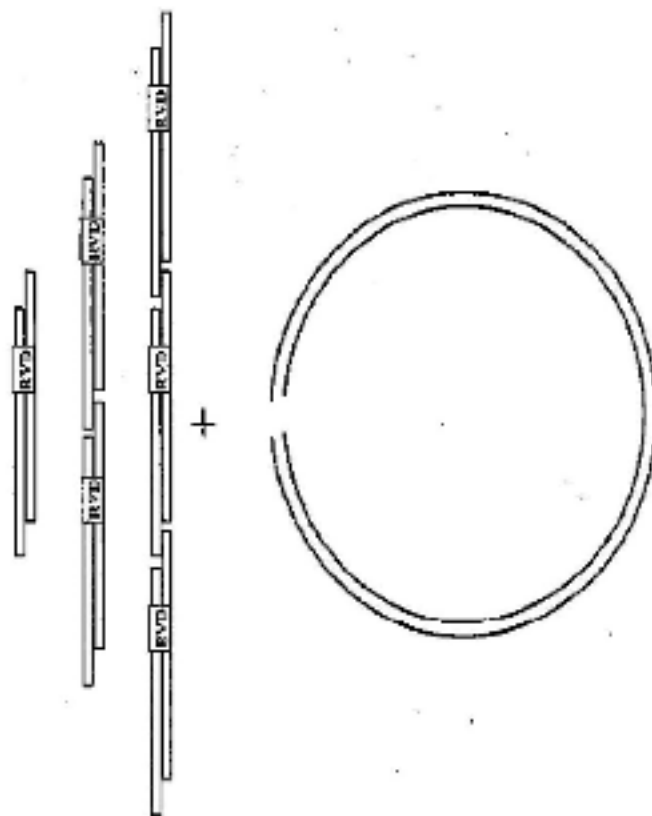
Şekil 9



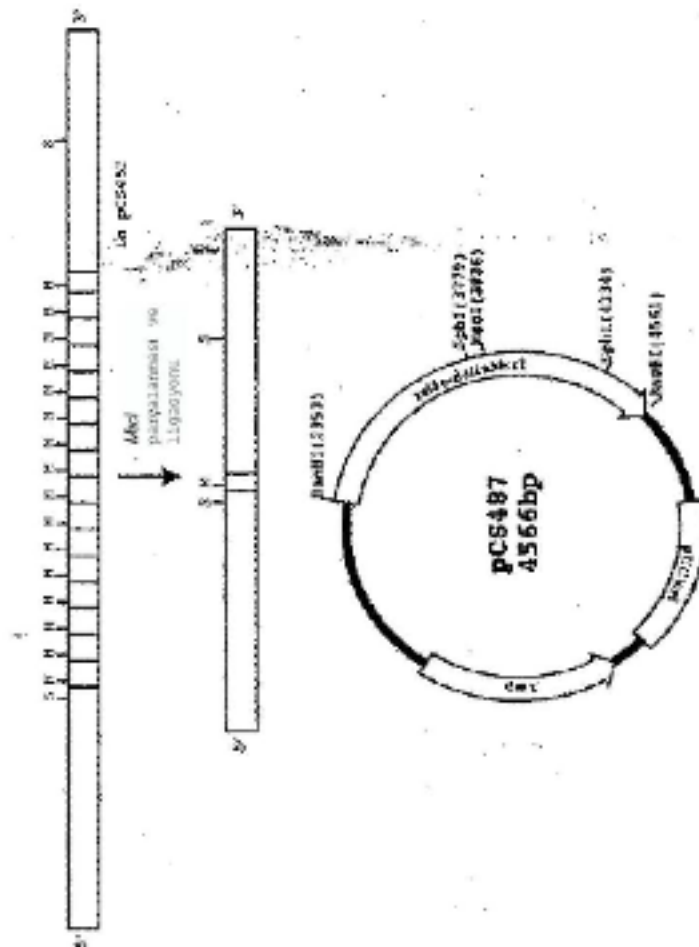
Şekil 10



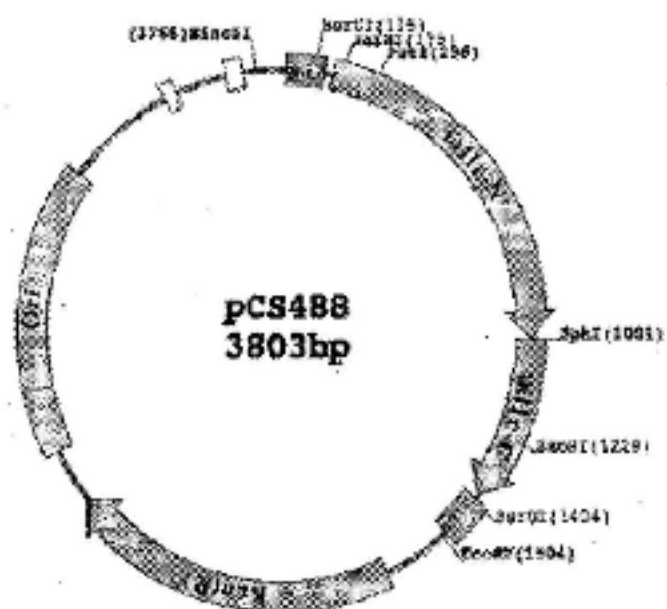
Şekil 11



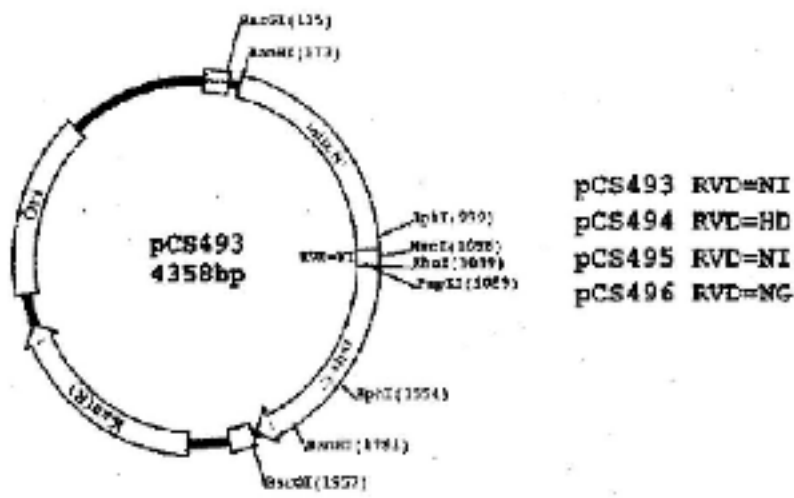
Şekil 13



Şekil 15



Şekil 16



Şekil 19

Plasma	Description
PC8008	NT
PC8009	ND
PC8010	NE
PC8011	NF

Plasma	Description
PC8009	NI-NI
PC8017	NI-ND
PC8018	NI-NE
PC8019	NI-NF
PC8020	ND-NI
PC8021	ND-ND
PC8022	ND-NE
PC8023	ND-NF
PC8024	NE-NI
PC8025	NE-ND
PC8026	NE-NE
PC8027	NF-NI
PC8028	NF-ND
PC8029	NF-NE

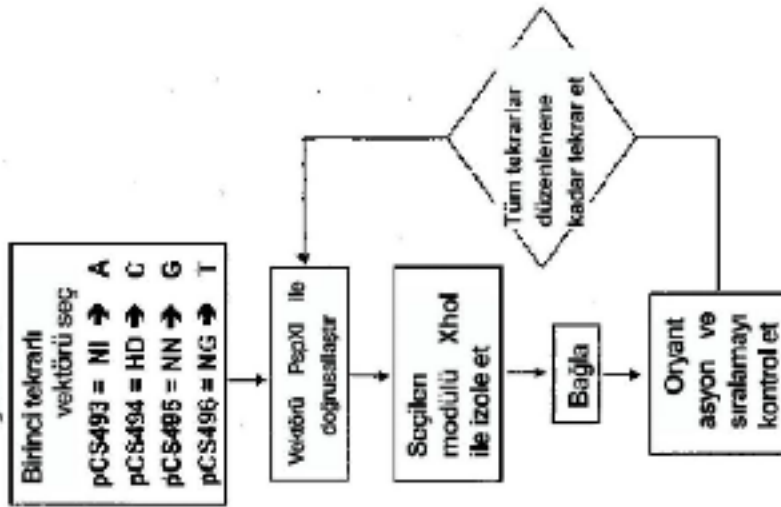
Plasma	Description
PC8038	NI-NT-NT
PC8039	NI-NT-ND
PC8040	NI-NT-NE
PC8041	NI-NT-NF
PC8042	ND-NT-NT
PC8043	ND-NT-ND
PC8044	ND-NT-NE
PC8045	ND-NT-NF
PC8046	NE-NT-NT
PC8047	NE-NT-ND
PC8048	NE-NT-NE
PC8049	NE-NT-NF
PC8050	NI-NT-NT
PC8051	NI-NT-ND
PC8052	NI-NT-NE
PC8053	NI-NT-NF
PC8054	ND-NT-NT
PC8055	ND-NT-ND
PC8056	ND-NT-NE
PC8057	ND-NT-NF

Plasma	Description
PC8068	ND-NI-NT
PC8069	NT-NT-NT
PC8070	ND-NI-ND
PC8071	ND-NI-NE
PC8072	ND-NI-NF
PC8073	NT-NT-ND
PC8074	NT-NT-NE
PC8075	NT-NT-NF
PC8076	ND-ND-NT
PC8077	ND-ND-ND
PC8078	ND-ND-NE
PC8079	ND-ND-NF
PC8080	NE-ND-NT
PC8081	NE-ND-ND
PC8082	NE-ND-NE
PC8083	NE-ND-NF
PC8084	NI-NT-NT
PC8085	NI-NT-ND
PC8086	NI-NT-NE
PC8087	NI-NT-NF
PC8088	ND-NT-NT
PC8089	ND-NT-ND
PC8090	ND-NT-NE
PC8091	ND-NT-NF
PC8092	NE-NT-NT
PC8093	NE-NT-ND
PC8094	NE-NT-NE
PC8095	NE-NT-NF

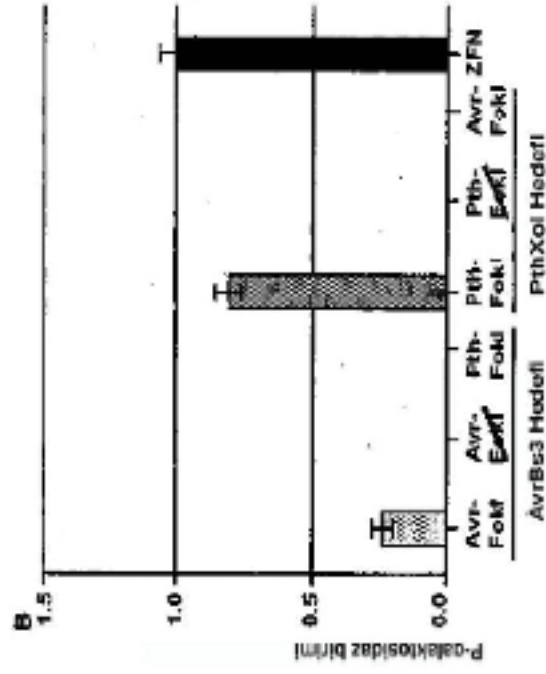
Plasma	Description
PC8096	NT-NT-NT
PC8097	NT-NT-ND
PC8098	NT-NT-NE
PC8099	NT-NT-NF
PC8100	ND-ND-NT
PC8101	ND-ND-ND
PC8102	ND-ND-NE
PC8103	ND-ND-NF
PC8104	NE-ND-NT
PC8105	NE-ND-ND
PC8106	NE-ND-NE
PC8107	NE-ND-NF
PC8108	NI-NT-NT
PC8109	NI-NT-ND
PC8110	NI-NT-NE
PC8111	NI-NT-NF
PC8112	ND-NT-NT
PC8113	ND-NT-ND
PC8114	ND-NT-NE
PC8115	ND-NT-NF
PC8116	NE-NT-NT
PC8117	NE-NT-ND
PC8118	NE-NT-NE
PC8119	NE-NT-NF

Plasma	Description
PC8120	NT-NT-NT
PC8121	NT-NT-ND
PC8122	NT-NT-NE
PC8123	NT-NT-NF
PC8124	ND-ND-NT
PC8125	ND-ND-ND
PC8126	ND-ND-NE
PC8127	ND-ND-NF
PC8128	NE-ND-NT
PC8129	NE-ND-ND
PC8130	NE-ND-NE
PC8131	NE-ND-NF
PC8132	NI-NT-NT
PC8133	NI-NT-ND
PC8134	NI-NT-NE
PC8135	NI-NT-NF
PC8136	ND-NT-NT
PC8137	ND-NT-ND
PC8138	ND-NT-NE
PC8139	ND-NT-NF
PC8140	NE-NT-NT
PC8141	NE-NT-ND
PC8142	NE-NT-NE
PC8143	NE-NT-NF

Şekil 20



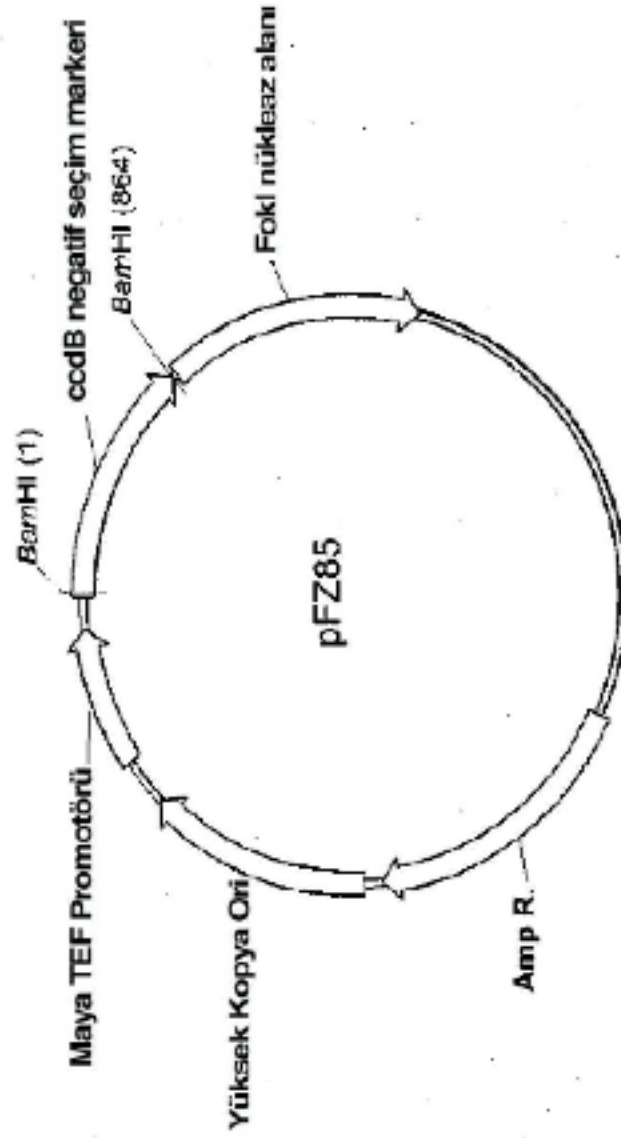
Şekil 22



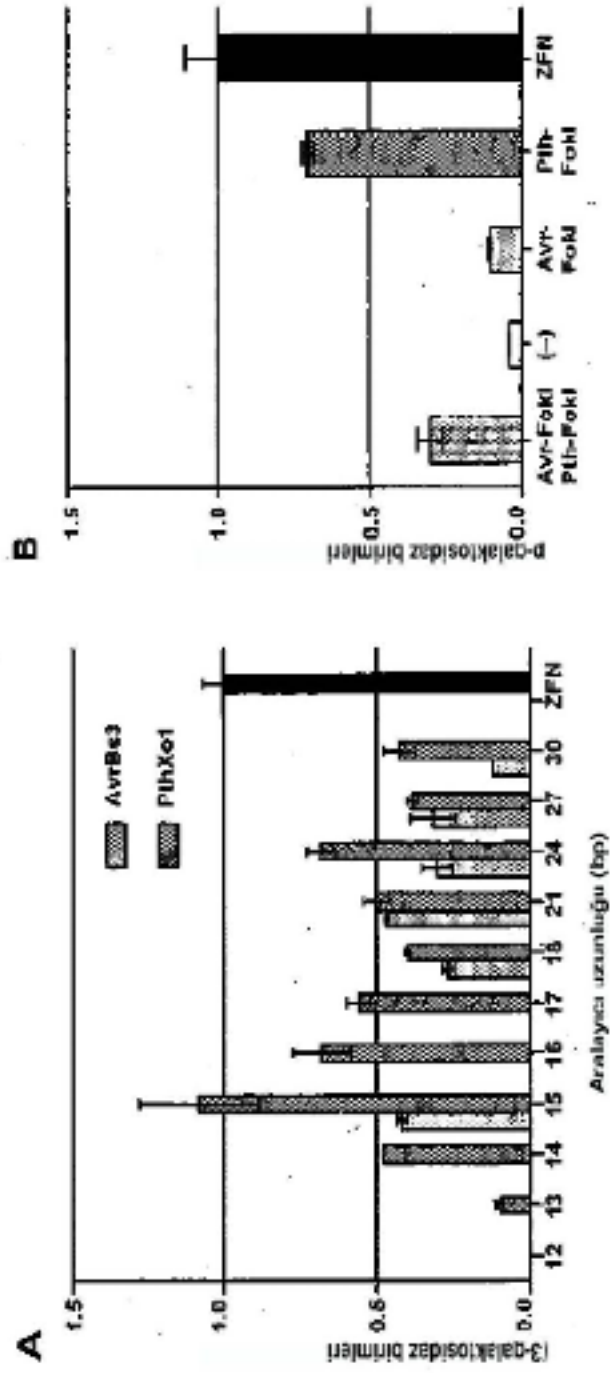
Şekil 23

MDPIRSRTPSFARELLNGPOFDRVQPTADRGGAPPAGGPGDGLPARRTMSRTRLPSPAPSPA#SAGSFSDLLRQFDP3
 LLDTSLDGMPAV3TPHTAAAPAECDDEVOSGLRAADDPPPTVTVAVTANFFFNAPAPPHHNAADPSIDAGPAAQVULHTL
 GYSQDQDEKIKPKYVGSSTVAQHNEALYGHGFTNAHIVALSRHFAALGTWVVKYQDMIAVLPBATHEDVGVGKQWASGARA
 LEALLTVAGELRGPPLOLDTGOLVYAKRSGVTAVEAMTASFNALTGAFLNLTPAQVVAIASNNK3KQDALETVORLLPVLCO
 QAHGLTPAGVVAIASHDGGKQDALETMORELLPVLCOAHGLTPDOVVAIASNIGGKQDALETVORLLPVLCOAHGLTPDOVVA
 IASHGGGKQDALETVORLLPVLCOAHGLTPDOVVAIASHDGKQDALETVORLLPVLCOAHGLTPDOVVAIASNIGGKQDALE
 TVORLLPVLCOAHGLTPDOVVAIASNIGGKQDALETVORLLPVLCOAHGLTPDOVVAIASHDGKQDALETVORLLPVLCOAH
 GLTPAGVVAIASHDGGKQDALETVOQLLPVLCOAHGLTPDOVVAIASNIGGKQDALETVORLLPVLCOAHGLTPDOVVAIASN
 GGGKQDALETVORLLPVLCOAHGLTPDOVVAIASNIGGKQDALETVORLLPVLCOAHGLTPDOVVAIASNIGGKQDALETVOR
 LLPVLCOAHGLTPDOVVAIASHDGGKQDALETVOGRLLPVLCOAHGLTPDOVVAIASNIGGKQDALETVORLLPVLCOAHGLT
 QEQVVAIASNIGGKQDALETVORLLPVLCOAHGLTPDOVVAIASNIGGKQDALETVORLLPVLCOAHGLTPAQVVAIASNIG
 KQDALETVORLLPVLCOAHGLTLAGVVAIASNIGGKQDALETVORLLPVLCOAHGLTPDOVVAIASNIGGKQDALETVORLLP
 VLCOAHGLTPDOVVAIASNIGGKQDALETVORLLPVLCOAHGLTLDQVVAIASNIGGKQDALETVORLLPVLCOAHGLTPDOV
 VAIASNIGGKQDALETVORLLPVLCOAHGLTPNOVVAIASNIGGKQDALESNAQLSRFDPAALATNDHLVALACLGGRPAM
 DAUYKGLPHAPELIRRNRRIGERTSHRVADYACVVRMLEFFQCHSHPAYAFDEAMTDFGMSRNGLVOLFRRVQVTELE
 ARQGTLPFASQRYVORILDASQMKRANPSPTSAGTHQASLHAFQDSLERDLDAPSPMHGGDGTGASSRKRSRSDRAVT
 QPSAQHSFEVRVFEQRDALHPLSYVRVKRPRTRIGGGLPDPGTPAADLVAASSTVMVBEQDAAPFAQAADOFPAPNEEL
 AAWELLPQSGSVGGTI (SEQ ID NO:31)

Şekil 25



Şekil 28

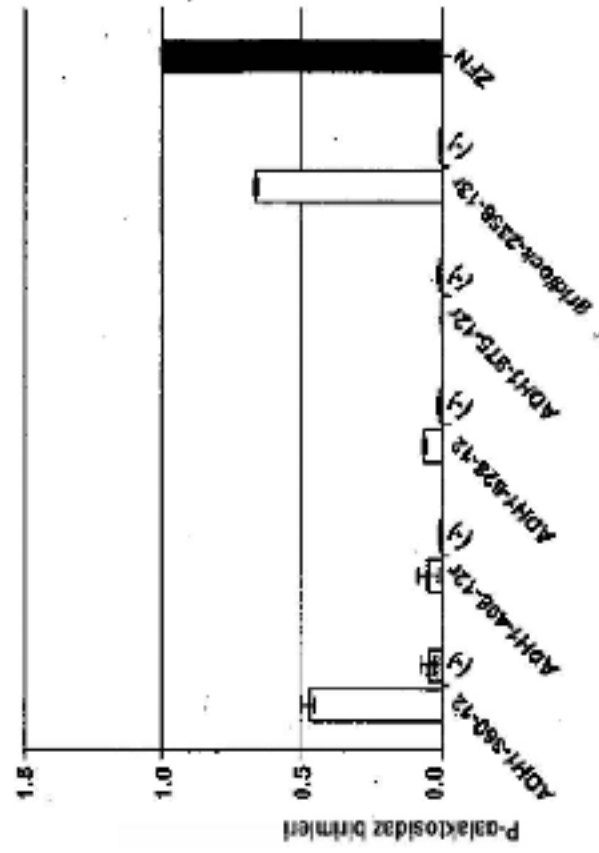


Şekil 29A

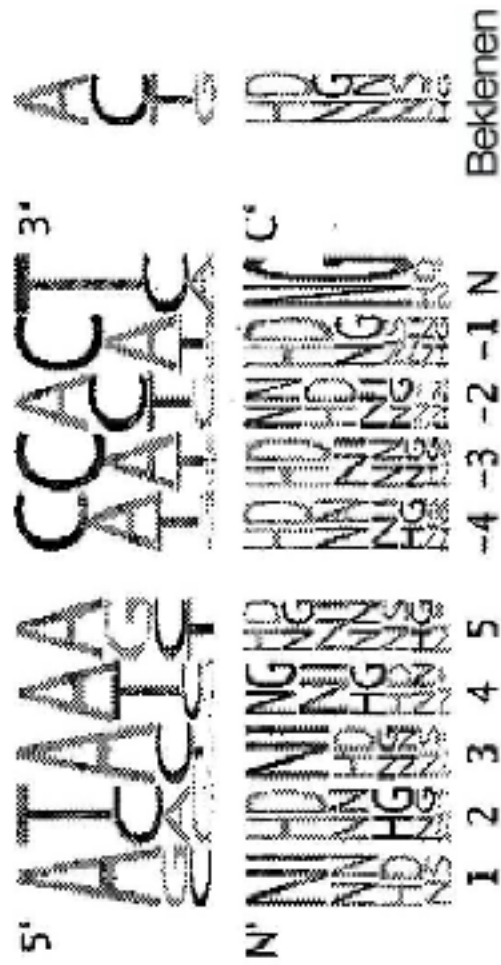
Özel TALEN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ADH1-303-12	NI A	NG T	HD C	NI A	NI A	NN G	NI A	NG T	NG T	HD C	NG T	HD C	
ADH1-408-12r	HD C	HD C	HD G	NI A	NN G	NI A	NI A	NI G	NG T	NI A	NI A	NI A	
ADH1-828-12	HD C	HD C	NN G	NN G	NI A	NG T	NN G	HD C	NG T	HD C	HD C	NG T	
ADH1-975-12r	NI A	NN C	NI A	HD C	NI A	NI A	NI A	HD C	HD C	NI A	HD C	NI A	
gndloc1-2356-13r	NI A	HD C	HD C	HD C	HD C	NG T	HD C	NG T	HD C	HD C	NN G	HD C	NG T

NI = A HD = C NN = G NG = T

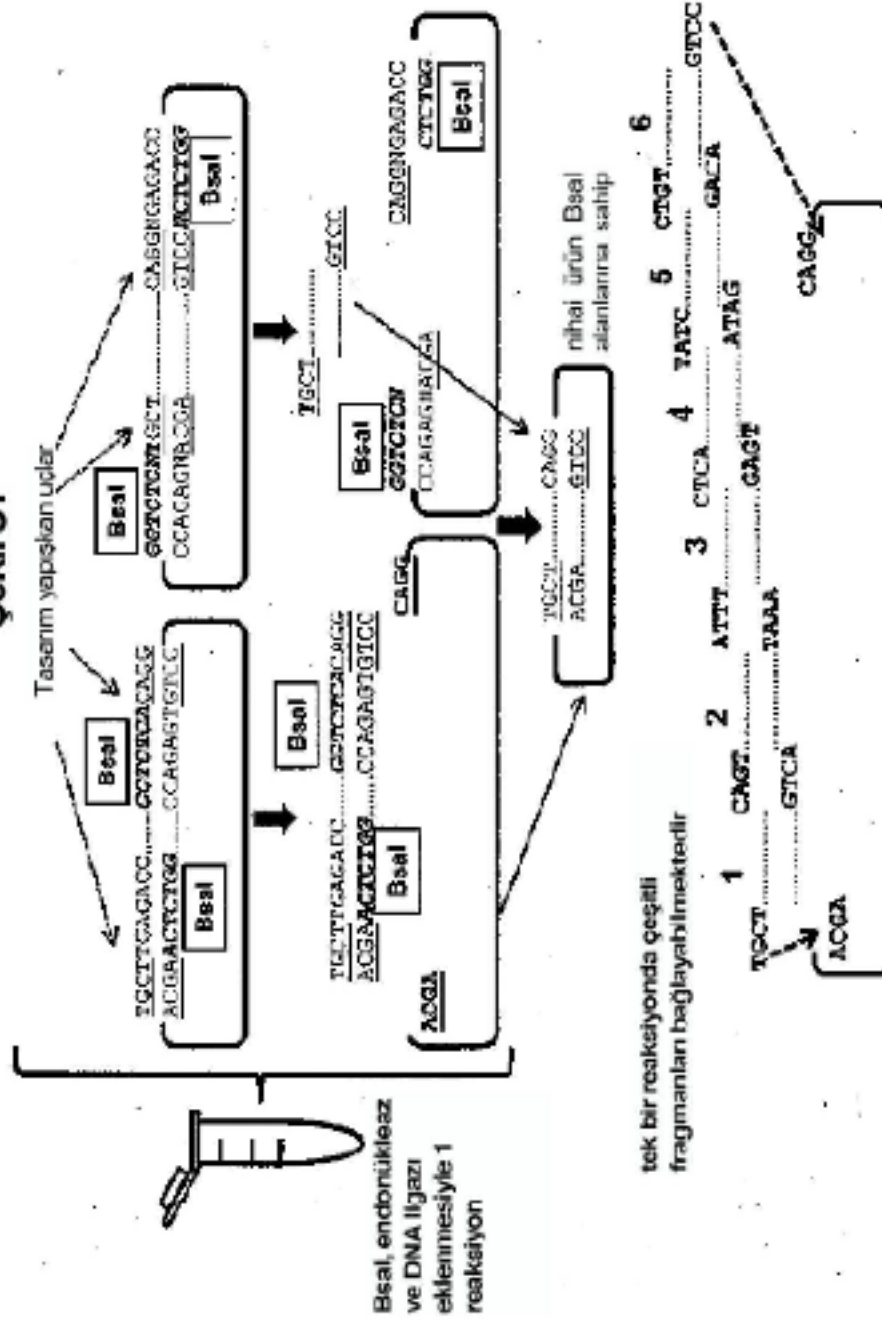
Şekil 29B



Şekil 30



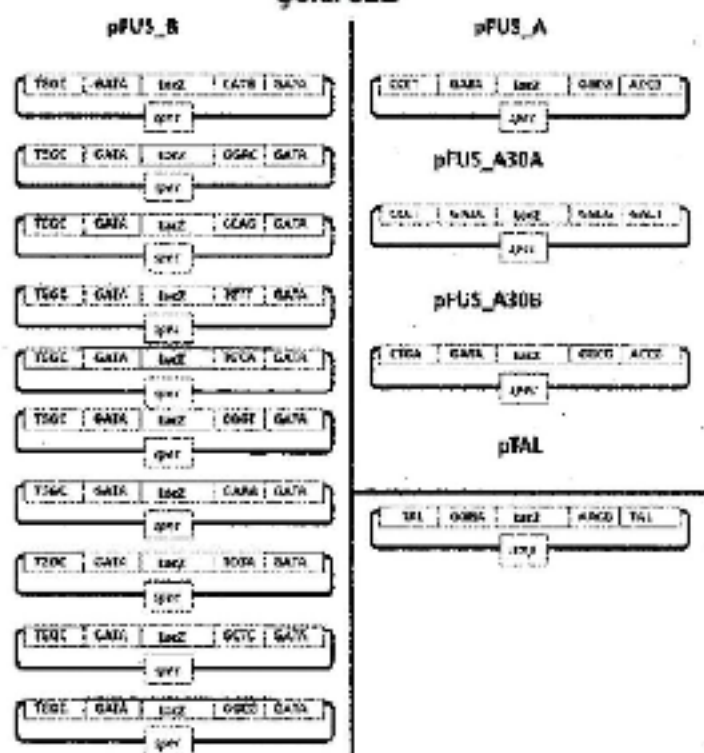
Şekil 31



Şekil 32A

	SH	HD	NN	NG
1	CTAT NO CAC	CTAT NO CAC	CTAT NO CAC	CTAT NO CAC
	10	10	10	10
2	CARH NO CCRH	CARH NO CCRH	CARH NO CCRH	CARH NO CCRH
	20	20	20	20
3	GGAC NO GGRG	GGAC NO GGRG	GGAC NO GGRG	GGAC NO GGRG
	30	30	30	30
4	CCAR NO ACAR	CCAR NO ACAR	CCAR NO ACAR	CCAR NO ACAR
	40	40	40	40
5	TGTT NO AGGT	TGTT NO AGGT	TGTT NO AGGT	TGTT NO AGGT
	50	50	50	50
6	TGCA NO GCGA	TGCA NO GCGA	TGCA NO GCGA	TGCA NO GCGA
	60	60	60	60
7	CGGT NO CTTT	CGGT NO CTTT	CGGT NO CTTT	CGGT NO CTTT
	70	70	70	70
8	GAAG NO AGGT	GAAG NO AGGT	GAAG NO AGGT	GAAG NO AGGT
	80	80	80	80
9	TGGA NO GCGA	TGGA NO GCGA	TGGA NO GCGA	TGGA NO GCGA
	90	90	90	90
10	CTTC NO CCGC	CTTC NO CCGC	CTTC NO CCGC	CTTC NO CCGC
	100	100	100	100
last	CTAT NO TTGC	CTAT NO TTGC	CTAT NO TTGC	CTAT NO TTGC
	1000	1000	1000	1000

Şekil 32B



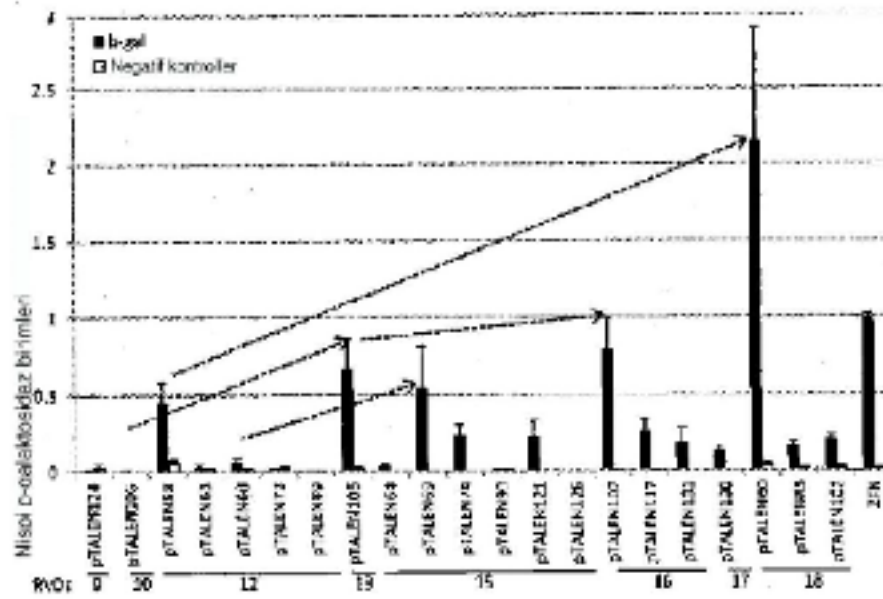
Şekil 34A

telomerase-TALEN124_9RVDs
 MASSEPPKKKKRVSWKDASGNWSRMHADPFIRPRRPS
 PARELLEPGPQPDVQPTADRGVSAPAGSPIDGLP
 ARRTVSRTLPSPPAPSPAFSAGSFSDLLRPFD
 SLLETSILDSMPAVGTPHTAAAPAEWDEAQSALR
 AADDEPPTVRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSD
 ASPAAQVDLRTLGYSSQQQEKIKPKVRSTVAQHH
 EALVGHGFTAHIVALSQHPAALGTVAVTYQHII
 TALPEATHEDIVGVGKQWNGARALEALLTDAGEL
 RGVPLQLDTGGQLVKIAKRGGVTAMEAVHASRNAL
 TGAPLNLTPAQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPV
 LCQDHGLTPDQVVAIANNNGGKQALETVQRLLPV
 LCQDHGLTPDQVVAIANNNGGKQALETVQRLLPV
 LCQDHGLTPDQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPV
 LCQDHGLTPDQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPV
 LCQDHGLTPDQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPV
 LCQDHGLTPDQVVAIANNNGGKQALETVQRLLPV
 LCQDHGLTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPV
 LCQDHGLTPDQVVAIASNGGGKQALESIVAQLSR
 RDPALAAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLPH
 APEFIRRVNRRRIAERTSHRVAOYAHVVRVLEFFQ
 CHSHPAHAFDEAMTQFGMSRHGLVQLFRRVGVTE
 FEARVGTLPFASQRWDRIQASGMKRAKPSPTSA
 QTPDQTS LHAFADSLERDLAPSPMHEGDQTRAS
 SKKRSRSDRAVTGPSAQQAVEVRVPEQRDALHLP
 LSWRYKRPRTIRINGGLPDPIRSQLVKSELEEKK
 SELRHKLKYPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKV
 NETFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDY
 GVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRN
 KHINPNEWVKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKA
 QLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLT
 LEEVRRKFNNGEINF (SEQ ID NO:35)

Şekil 34N

telomerase-TALEN126_15RVDs
 MASSP3KKKKKVSXNDASGMSRMHADFIRPRRPS
 PARELLPGGPQORVQPTADRGVSAPAGSPIDGLP
 ARRTVSRTRLPSPPAPSPAFSAGSFSOLLRPFD
 SLLDTSLLDQMPAVGTENIAAPAENDEAQSAIR
 AADOPFPPTVRVAVTAARPPRAKPAARRRAAQPSD
 ASPPAAQVDLRTLGYSQQQQEKIKPKVRSSTVAQHH
 EALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTAVVYQHII
 TALPEATHEDIVGVGKQWSGAPALEALLTDAGEL
 RGPFLQLOTGQLVKIAKRGGVTAEEAVHASRNAL
 TGAPLNLTPAQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPV
 LCQOHGLTPDQVVAIANNGGKQALETVQRLLPV
 LCQOHGLTPDQVVAIANNGGKQALETVQRLLPV
 LCQOHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV
 LCQOHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV
 LCQOHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV
 LCQOHGLTPDQVVAIANNGGKQALETVQRLLPV
 LCQOHGLTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPV
 LCQOHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV
 LCQOHGLTPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPV
 LCQOHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV
 LCQOHGLTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPV
 LCQOHGLTPDQVVAIANNGGKQALETVQRLLPV
 LCQOHGLTPDQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV
 LCQOHGLTPDQVVAIASNNGGKQALESTIVAQLSR
 RDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLPH
 APEFIRRVNRRIAERTSHRVADYARVVRVLEFTQ
 CHSHPAHAFDEAMTQFGMSRHGLVQLFRVGVTE
 FEARYGTLPPASQWDRILQASGMKRAKPSPTSA
 QTFDQTSLHAFADSLERDLAPSPMHEGDQTRAS
 SRKRSRSDRAVTGPSAQQAQVEVRVPEQRDALHLP
 LSNRVKRPRTRIWGGLSDPISRSQLVKSELEKK
 SELAHKLKYVPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKV
 MEFTMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDY
 GVIVDTKAYSGGYNLPICQADEMQRYVEENQTRN
 KHINPNENMKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKA
 QLTRLNHITNCGAVLSVEELLIGSEHIKAGTLT
 LEEVRRKFNNGEINF (SEQ ID NO:48)

Şekil 35

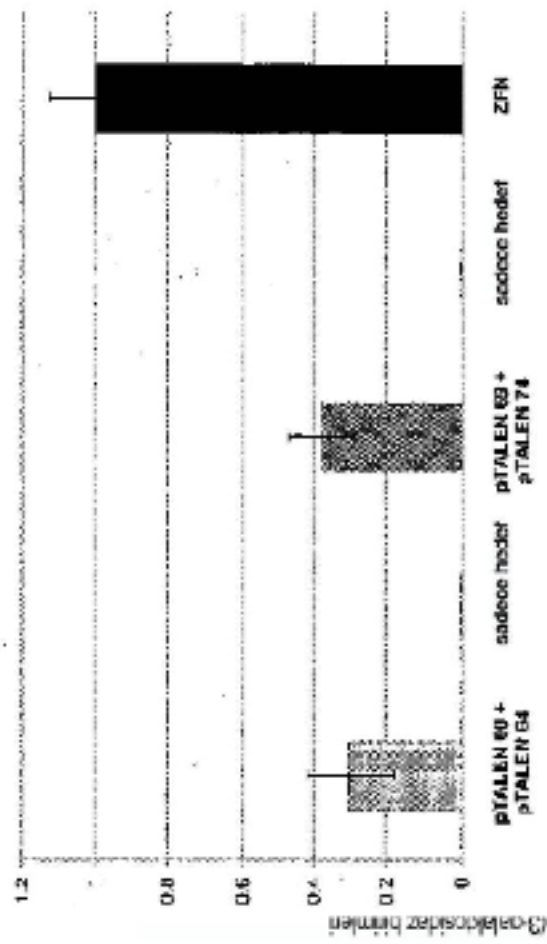


Şekil 36

A

	<u>pTALEN 60 hedefi</u>	<u>pTALEN 64 hedefi</u>
Adh1 hedefi	TATCAAGATTCTCTTCAGTTCTGTCTGTGTCACACCGGATGTTTACTTCTGGGA (SEQ ID NO:56)	
	<u>pTALEN 69 hedefi</u>	<u>pTALEN 74 hedefi</u>
Adh1 hedefi	TCCGGATGCTCTCTTGACAAAGGCTGTGTATTGTCAAGTTGGTTTGCTA (SEQ ID NO:57)	

B



Şekil 37



B

ADH1	1	10	20	30	40	48	(SEQ ID NO:58)
Dedisi line	CCGGATGCTCCCTCTT	ACACAGGCTCTG	TATTGTCAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	
	CCGGATGCTCCCTCTT	ACACAGGCTCTG	TATTGTCAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	-8 (SEQ ID NO:59)
	CCGGATGCTCCCTCTT	ACACAGGCTCTG	TATTGTCAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	-5 (SEQ ID NO:60)
	CCGGATGCTCCCTCTT	ACACAGGCTCTG	TATTGTCAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	-15 (SEQ ID NO:61)
	CCGGATGCTCCCTCTT	ACACAGGCTCTG	TATTGTCAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	-5 (SEQ ID NO:62)
	CCGGATGCTCCCTCTT	ACACAGGCTCTG	TATTGTCAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	0 (SEQ ID NO:58)
	CCGGATGCTCCCTCTT	ACACAGGCTCTG	TATTGTCAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	-7 (SEQ ID NO:63)
	CCGGATGCTCCCTCTT	ACACAGGCTCTG	TATTGTCAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	-4 (SEQ ID NO:64)
	CCGGATGCTCCCTCTT	ACACAGGCTCTG	TATTGTCAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	0 (SEQ ID NO:58)
	CCGGATGCTCCCTCTT	ACACAGGCTCTG	TATTGTCAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	TGGTCTAGT	0 (SEQ ID NO:58)

Şekil 38

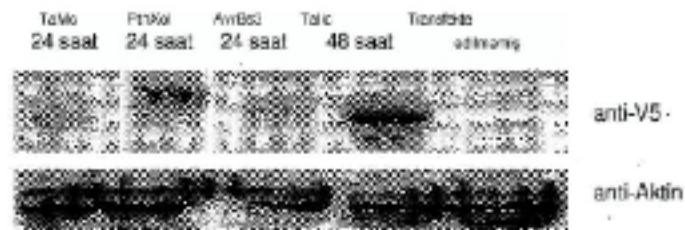
A

AviKahl	LDTGQL	KIAKRG	GVTA	EAVH	ARNALT	GAPLN	(SEQ ID NO: 65)
AviBs3	LDTGQL	KIAKRG	GVTA	EAVH	ARNALT	GAPLN	(SEQ ID NO: 66)
PthXol	LDTGQL	KIAKRG	GVTA	EAVH	ARNALT	GAPLN	(SEQ ID NO: 67)
PthA	LDTGQL	KIAKRG	GVTA	EAVH	ARNALT	GAPLN	(SEQ ID NO: 68)
TallC	LDTGQL	KIAKRG	GVTA	EAVH	ARNALT	GAPLN	(SEQ ID NO: 69)

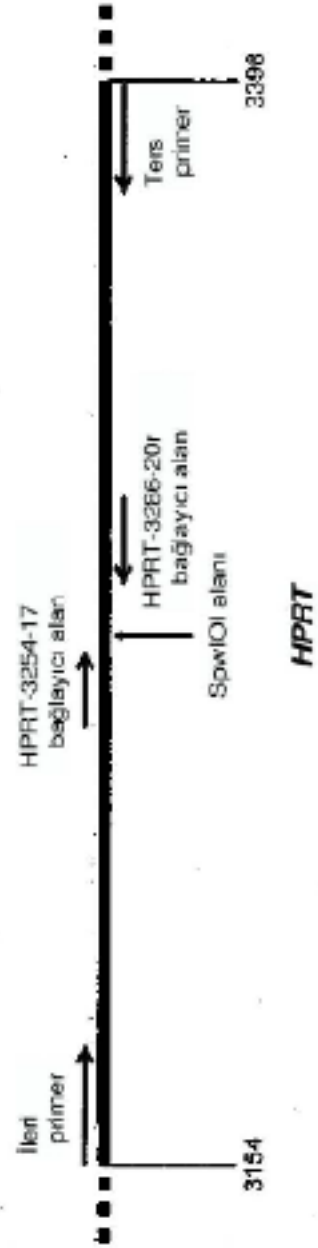
B

"0." tekrar	HHHHHHHH	HHHHHHHHHHHHHH
	LDTGQLVKIA*	KRGCVTAMEAVHARNALT
1. tekrar	LTPAQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVL	QAHG (SEQ ID NO: 71)
	HSSEEEE	HHHHHHHHHHHHHH

Şekil 39



Şekil 41A



5

Şekil 41B

