



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **334058**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12Q 1/37 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

Patentstyret

| | | | | | |
|------|------------|---|------|---------------------------|--------------------------------|
| (21) | Søknadsnr | 20056029 | (86) | Int.inng.dag og søknadsnr | 2004.04.29 PCT/EP2004/04550 |
| (22) | Inng.dag | 2005.12.19 | (85) | Videreføringsdag | 2005.12.19 |
| (24) | Løpedag | 2004.04.29 | (30) | Prioritet | 2003.05.26, EP, 03011807 |
| (41) | Alm.tilgj | 2006.02.24 | | | |
| (45) | Meddelt | 2013.12.02 | | | |
| (73) | Innehaver | Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Brüningstrasse 50, DE-65926 FRANKFURT AM MAIN, Tyskland | | | |
| (72) | Oppfinner | Luc Mercken, 18, bis rue Jules Joffrin, FR-94100 SAINT-MAUR, Frankrike Ekkehard Leberer, Fichtenstrasse 82B, DE-82100 GERMERING, Tyskland Jonathan Rothblatt, Sämannstrasse 102, DE-81249 MÜNCHEN, Tyskland Edmund Hoppe, Gartenstrasse 12, DE-82152 KRAILLING, Tyskland Gisela Peraus, Agnes-Ernauer-Strasse 15, DE-80687 MÜNCHEN, Tyskland Sylvie Dreisler, 51, Avenue Carnot, FR-91370 VERRIERES, Frankrike | | | |
| (74) | Fullmektig | Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge | | | |

| | | | | |
|------|-----------------------|--|--|--|
| (54) | Benevnelse | Prosess for deteksjon av gammasekretase aktivitet samt anvendelse derav | | |
| (56) | Anførte publikasjoner | WO 0034511 A2 | | |
| (57) | Sammendrag | | | |

Oppfinnelsen vedrører en forbedret prosess for bestemmelsen av γ -sekretaseaktiviteten, individuelle komponenter i prosessen og anvendelsen av prosessen. Den foreliggende oppfinnelsen vedrører en forbedret prosess for bestemmelsen av γ -sekretaseaktiviteten og for deteksjonen av γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase, eller en γ -sekretaselignende proteinase. Bestemte utførelsesformer av prosessen vedrører på den ene siden prosesser for identifisering av en γ -sekretase eller av et cDNA som koder for en γ -sekretase, et subenhetsprotein og γ -sekretase eller en γ -sekretaselignende proteinase og på den andre siden til prosesser for å identifisere substanser som kan hemme aktiviteten av en γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase eller en γ -sekretaselignende protease. Slike substanser har spesiell viktighet ettersom de kan anvendes for eksempel som farmasøytisk aktive forbindelser, for eksempel for behandlingen av Alzheimers sykdom.

Foreliggende oppfinnelse vedrører forbedrede prosesser for bestemmelse av γ -sekretase aktivitet.

Alzheimers sykdom (AD) er en neurodegenerativ sykdom i hjernen som følges på det
5 cellulære nivået av et massivt tap av neuroner i det limbiske systemet og i den cerebrale
hjernebarken. I hjernen kan områder som er affisert, proteindeponeringer, såkalte plakk,
oppdages på det molekylære nivået, som er en vesentlig karakteristikk for Alzheimers
sykdom. Proteinet som oftest finnes i disse plakkene er et peptid på 40-42 aminosyrer
som betegnes som A β -peptid. Dette A β -peptid er et kløyvingsprodukt fra et signifikant
10 større protein på 695-770 aminosyrer, det såkalte amyloide forløperproteinet (APP).

APP er et integraltransmembranprotein som først går gjennom lipidlaget. Størstedelen
av proteinet er ekstracellulært, mens det kortere C-terminale domene er rettet inn mot
cytosol (figur 1). A β -peptidet er vist mørkegrått i figur 1. Ca $\frac{2}{3}$ av A β -peptidet kommer
15 fra det ekstracellulære domene, og ca $\frac{1}{3}$ fra det transmembrane domene av APP.

Foruten membranbaserte APP, kan en utskilt form av amyloidforløperproteinet
detekteres som består av det store ektodomene til APP og blir betegnet som APP_{sec}
("utskilt APP"). APP_{sec} dannes fra APP ved proteolytisk kløyvning som utføres av α -
20 sekretasen. Den proteolytiske kløyvningen skjer på et sted i aminosyresekvensen til
APP som er innen aminosyresekvensen til A β -peptidet (etter aminosyreresidue 16 i A β -
peptidet). Proteolyse av APP ved α -sekretasen ekskluderer dermed dannelsen av A β -
peptidet.

25 A β -peptidet kan dermed bare dannes fra APP i en alternative prosesseringsrute. Det er
postulert at to videre proteaser er involvert i denne prosesseringsrute, en protease som er
betegnet som β -sekretase, som kløyver ved den N-terminale enden av A β -peptidet i
APP, og den andre proteasen som er betegnet γ -sekretase, som frigjør den C-terminale
delen av A β -peptidet (Kang, J. et al., Nature, 325, 733) (figur 1).

30 Å lære mer om sekretasene (α -sekretase, β -sekretase, γ -sekretase) er av stor interesse,
spesielt i sammenheng med undersøkelser på Alzheimers sykdom, for eksempel for
identifiseringen av sekretasene eller faktorer som er involvert i sekretaseregulering og
A β -peptiddannelse (Wolfe, M.S. (2001), J. Med. Chem., 44(13), 2039-2060).

35 Hemmingen av β -sekretase og spesielt av γ -sekretase kan føre til en reduksjon i A β -
produksjonen, på den andre siden kan en aktivering av α -sekretasen øke prosesseringen
av APP i APP_{sec}, og ville dermed samtidig redusere dannelsen av A β -peptidet. En

transgen *C. elegans* som er funnet under slike undersøkelser, er beskrevet i den tyske patentsøknaden DE 198 49 073 A1.

Det er mange indikasjoner på at A β -peptidet (A β) er en viktig faktor ved
5 tilstedeværelsen av Alzheimers sykdom. Blant annet er nevrotoksisitet av A β -fibriler i
cellekultur blitt postulert (Yankner, B.A. et al., (1990) Proc Natl Acad Sci USA, 87,
9020). I pasienter med Downs syndrom, hvor genet som koder for APP finnes i en
tilleggs kopi, har man også de nevrologiske karakteristikene til Alzheimers sykdom
selv ved en alder på 30 år. Her antas det at overuttrykket av APP følger en økt
10 omdannelse til A β -peptidet (Rumble, B. et al., (1989), N. Engl. J. Med., 320, 1446).

Antagelig er den sterkeste indikasjonen på den sentrale rollen til A β -peptidet de
familiære formene til Alzheimers sykdom. Mutasjoner som her finnes i APP-genet
rundt området for β - og γ -sekretasekløvningsstedene eller i to videre AD-assosierte
15 gener (preseniliner), som i cellekultur fører til en signifikant økning i A β -
peptidproduksjon (Scheuner, D. et al., (1996), Nature Medicine, 2, 864).

Det er en rekke indikasjoner på det faktum at APP først kløyves til A β -peptidet av β -
sekretasen iløpet av dens prosessering for å tjene deretter som et substrat for γ -sekretase.
20 γ -sekretasen har derfor en viktig rolle i dannelsen av A β -peptidet (Wolfe, M.S. (2001),
loc.cit).

Generelt er deteksjonen av A β -peptid vanskelig, fordi bare en liten mengde APP blir
omdannet (Simons M, et al., Neurosci (1996) 1;16(3):899-908). Videre er A β -peptidet
25 et veldig lite fragment på ca 4 kDa, som har en stor tendens til selvaggregering, som
skyldes dets hydrofobe karakter. Følgelig presipiterer A β -peptid lett under fysiologiske
tilstander (Hilbich, C. et al., (1991) J. Mol. Biol., 218, 149) og er i sin presipiterte form
ikke tilgjengelig for deteksjon.

30 Deteksjonen av A β -peptidet i eukaryote celler utføres ved hjelp av immunbiologiske
fremgangsmåter slik som for eksempel ELISA, immunpresipitering og Westernblotting
(Suzuki, N. et al., Science 1994, 27, 264(5163) 1336; Haass, C. et al., (1992) Nature,
359, 322). En in vitro-analyse for bestemmelsen av γ -sekretaseaktivitet fra rensede
membranfraksjoner som inneholder PS1 (presenilin 1) ble videre beskrevet av Wolfe et
35 al. (1999). Disse prosesser er veldig tidkrevende ettersom de involverer
inkuberingstrinn med passende antistoff, trinn for å ødelegge cellene som skaffes tilveie
fra passende cellekulturer eller modellorganismer (for eksempel *C. elegans*). De nevnte

fremgangsmåtene er ikke passende i et automatisert analysesystem, for eksempel for høy kapasitetsscreening, og for å identifisere forbindelser, som spesifikk hemmer eller senker aktiviteten av en γ -sekretase. Delvis skyldes dette at γ -sekretaseaktivitet er avhengig av en sammenstilning av proteiner (Mattson, (2003) Nature 422, 385), som på
5 det nåværende tidspunkt bare er aktiv i et komplekst membranlipidmiljø.

Aktiviteten til γ -sekretasen kan videre påvises som angitt i WO00/34511A2, som beskriver en prosess for bestemmelsen av γ -sekretaseaktivitet og for deteksjonen av γ -sekretase ved deteksjonen av A β -peptidet. Prosessen beskrevet i WO00/34511A2
10 benytter et transgen som koder for et fusjonsprotein som omfatter aminosyresekvensen GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ IDNR. 1) som det enzymatiske målstedet for γ -sekretase, et signalpeptid (SP) i den 5' enden, en promoter og, hvis det er passende, videre kodende og/eller ikke-kodende nukleotidsekvenser, som er inkorporert i en celle for å uttrykke det nevnte fusjonsproteinet.

15 Når fusjonsproteinet blir spesifikt kløvet av γ -sekretasen som er tilstede i cellen, blir et første delprotein dannet som inneholder aminosyresekvensen GAIIGLMVGGVV (SEQ IDNR. 2), og et andre delprotein som inneholder aminosyresekvensen VIVITLVML (SEQ IDNR. 3). Deretter blir det nevnte første og/eller andre delproteinet detektert, for
20 eksempel ved å anvende en passende reporter, som for eksempel er et reporter-gen, som blir aktivert ved frigjøringen av en transkripsjonsaktivator koblet til det første og/eller andre delproteinet.

Grunnet de kjente problemene som følger deteksjonen av A β -peptid, så er målet med den foreliggende oppfinnelsen å forbedre prosessen i WO00/34511A2, for eksempel
25 ved å senke bakgrunnssignalet og/eller å øke signalspesifisiteten, for å forbedre signal/bakgrunnsforholdet i analysen.

Overraskende er det mulig å forbedre signal/bakgrunnsforholdet i en prosess ifølge
30 WO00/34511A2 ved å senke den uspesifikke frigjøringen av første og/eller andre delvise protein som skyldes den uspesifikke proteaseaktiviteten. Dette oppnås for eksempel i fusjonspeptidet i WO00/34511A2, ved eksklusjonen/unngåelsen av noen andre sekvenser/motiver for proteasekløvningssete og/eller internaliseringssekvenser –
ved siden av γ -sekretasekløvningssete. Den foreliggende oppfinnelsen vedrører derfor
35 en forbedret prosess for bestemmelsen av γ -sekretaseaktivitet og deteksjonen av et protein som har γ -sekretaseaktivitet.

Bestemte utførelsesformer av prosessen vedrører prosesser for identifikasjonen av en γ -sekretase, av et cDNA som koder for en γ -sekretase, et subenhetprotein av γ -sekretase, eller en γ -sekretaselignende proteinase, og prosesser for identifikasjonen av en farmasøytisk aktiv forbindelse som kan modulere for eksempel senke eller hemme aktiviteten av et protein som har γ -sekretaseaktivitet. Slike substanser er av spesiell interesse hvis de er farmasøytisk akseptable og passende for behandlingen av Alzheimers sykdom.

Et første aspekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører en prosess for deteksjonen av aktiviteten til γ -sekretase, hvori

A. et transgen som koder for et fusjonsprotein blir anvendt, hvori nevnte transgen omfatter:

- a) en første nukleotidsekvens som koder for et protein som inneholder aminosyresekvensen GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ IDNR. 1), hvori nevnte protein kan kløyves inne i nevnte aminosyresekvens av γ -sekretase som er tilstede i en celle; hvorved et første delprotein, som inneholder aminosyresekvensen GAIIGLMVGGVV (SEQ IDNR. 2), og et andre delprotein som inneholder aminosyresekvensen VIVITLVML (SEQ IDNR. 3) blir dannet;
- b) ved 5' enden av den første nukleotidsekvensen er det en andre nukleotidsekvens som koder for et signalpeptid;
- c) en promoter; og
- d) ytterligere kodende nukleotidsekvenser som koder for et protein som blir uttrykt som et fusjonsprotein med nevnte første delprotein og nevnte andre delprotein og som blir anvendt for deteksjon av det nevnte andre delprotein, og hvis passende ytterligere ikke-kodende nukleinsyresekvenser;

B. dette transgen blir inkorporert inn i en human celle *in vitro* eller en ikke-human eukaryot celle og fusjonsproteinet blir uttrykt;

C. fusjonsproteinet blir kløvet inne i aminosyresekvensen SEQ IDNR. 1 av γ -sekretasen som er tilstede i cellen hvorved det første delprotein og det andre delprotein blir dannet; og

D. det andre delproteinet blir detektert;

kjennetegnet ved at nevnte fusjonsprotein, med unntak av SEQ IDNR. 1, ikke inneholder en eller flere peptidmotiver som virker som et signal for endo- eller eksocytose og/eller proteasekløvningssete.

Et andre aspekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører en prosess for deteksjonen av aktiviteten til γ -sekretase, hvori

A. et transgen som koder for et fusjonsprotein blir anvendt, hvori nevnte transgen inneholder følgende bestanddeler:

- 5 a) en første nukleotidsekvens som koder for et protein som inneholder aminosyresekvensen GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ IDNR. 1), hvori nevnte protein kan kløyves inne i nevnte aminosyresekvens av γ -sekretase som er tilstede i en celle; hvorved et første delprotein, som inneholder aminosyresekvensen GAIIGLMVGGVV (SEQ IDNR. 2), og et
- 10 andre delprotein som inneholder aminosyresekvensen VIVITLVML (SEQ IDNR. 3) blir dannet;
- b) ved 5' enden av den første nukleotidsekvensen er det en andre nukleotidsekvens som koder for et signalpeptid;
- c) en promoter; og
- 15 d) ytterligere kodende nukleotidsekvenser som koder for et protein som blir uttrykt som et fusjonsprotein med nevnte første delprotein og nevnte andre delprotein og som blir anvendt for deteksjon av det nevnte andre delprotein, og hvis passende ytterligere ikke-kodende nukleinsyresekvenser;

B. dette transgen blir inkorporert inn i en human celle *in vitro* eller en ikke-human eukaryot celle og fusjonsproteinet blir uttrykt;

C. fusjonsproteinet blir kløvet inne i aminosyresekvensen SEQ IDNR. 1 av γ -sekretasen som er tilstede i cellen hvorved det første delprotein og det andre delprotein blir dannet; og

D. mengde av det andre delproteinet blir bestemt og aktiviteten til γ -sekretasen blir

25 bestemt utifra mengde av det andre delprotein som blir dannet; kjennetegnet ved at nevnte fusjonsprotein, med unntak av SEQ IDNR. 1, ikke inneholder en eller flere peptidmotiver som virker som et signal for endo- eller eksocytose og/eller proteasekløyvningssete.

30 Prosessene ifølge oppfinnelsen er passende for *in vivo*-deteksjon av en γ -sekretase (protein som har γ -sekretaseaktivitet) eller av aktiviteten til en γ -sekretase, som muliggjør å benytte prosessene universelt, selv for eksempel i høy kapasitetsscreening ("HTS")-analyser. Prosessene har ikke de ovenfor nevnte ulempene til de konvensjonelle deteksjonsprosessene, spesielt unngås laboratorieisolering og

35 deteksjonstrinn og det spesifikke signalet til γ -sekretaseaktiviteten er signifikant forbedret. Det mer spesifikke signalet oppnås ved hjelp av et betraktelig redusert

bakgrunnssignal og unngåelse, henholdsvis senking av frigjøringen av det første og andre delprotein som skyldes virkningen til uspesifikke proteaser.

Et viktig element i prosessene ifølge oppfinnelsen er at det C-terminale APP-fragmentet som kløyves av γ -sekretasen til to fragmenter – et første delprotein som inneholder aminosyresekvensen GAIIGLMVGGVV (SEQ IDNR. 2) og et andre delprotein som inneholder aminosyresekvensen VIVITLVML (SEQ IDNR. 3), det andre delprotein som inneholder aminosyresekvensen VIVITLVML (SEQ IDNR. 3) diffunderer inn i cellers cytosol (figur 2). Dette andre delprotein som lett kan detekteres i cytosol til en celle, for eksempel som et fusjonsprotein med en transkripsjonsaktivatorfaktor (TAF) og ved hjelp av et reporter-gen; tjener som et deteksjonsredskap for tilstedeværelsen av γ -sekretase eller kvantifisering av en γ -sekretaseaktivitet. γ -sekretasekløyvningssete er lokalisert i transmembran domene til APP (Kang, J. et al., (1987) Nature, 325, 733). APP transmembran domene har aminosyresekvensen GAIIGLMVGGVV₄₀ IA₄₂ TVIVITLVML. γ -sekretasen kløyver etter V₄, A₄₂ eller T₄₃. A β -peptider som produseres av eukaryote celler i cellekultur utskilles i mediesupernatanten.

Med hjelp av et passende reportersystem (for eksempel TAF og det korresponderende reporter-genet), så kan frigjøringen av det andre delprotein aktivere uttrykket av et reporterprotein, som kan detekteres i eukaryote celler. Ved hjelp av deteksjonen av reporterprotein kan det demonstreres at en γ -sekretasekløyvning har funnet sted i APP. Som et resultat kan γ -sekretasen eller aktiviteten av γ -sekretasen bestemmes kvalitativt og/eller kvantitativt.

Bestanddelene til prosessen kan karakteriseres i større detalj som følger:

Den første nukleotidsekvensen koder for et amyloidforløperprotein (APP) eller en del av det som omfatter SEQ IDNR. 1, hvor nevnte APP eller del av det ikke inneholder noen videre peptidmotiv som virker som et signal for endo- eller eksocytose og/eller proteasekløyvningssete. Helst koder nevnte første nukleotidsekvens for et protein som inneholder en aminosyresekvens som omfatter SEQ IDNR.1, for eksempel SEQ IDNR. 6 eller SEQ IDNR. 14. I videre utførelsesformer koder den første nukleotidsekvensen for et avkortet APP eller et modifisert APP, for eksempel som kan skaffes tilveie ved hjelp av setedirigert mutagenese, for å unngå kodingen av et peptidmotiv som virker som et signal for endo- eller eksocytose og/eller proteasekløyvningssete ved siden av SEQ IDNR. 1. I enda en annen utførelsesform er nevnte APP eller del av det, som kodes

for av den nevnte første nukleotidsekvensen, et protein utledet fra APP hos mennesker, mus (for eksempel APLP1 eller APLP2).

Den andre nukleotidsekvensen koder helst for ethvert passende signalpeptid ("SP").

5 Signalpeptidet inneholder for eksempel SP'ene ifølge SEQ IDNR. 5 (SP til humant APP), SEQ IDNR. 12 (SP til gjær SUC2, "SP2") eller SEQ IDNR. 13 (SP til BM40, "SP3") eller ethvert annet signalpeptid som er kjent for eksempel ifølge Heijne et al. (Nucl. Acids. Res. (1986), 14(11) 4683-4690).

10 Som en promoter er det mulig å anvende enhver passende regulerbar eller konstitutiv promoter. Promoterer kan være passende for eksempel for ekspresjon i pattedyrceller, i *C. elegans*, i gjær eller i *Drosophila*. Passende promoterer for pattedyrceller er for eksempel CMV, HSV, TK, SV40, LTR (alle: Clontech, Heidelberg, Tyskland), og RSV (for eksempel Invitrogen™ life technologies, NV Leek, Nederland). Promotere som kan
15 anvendes for *C. elegans* er for eksempel *unc-119*, *unc-54*, *hsp16-2*, *goa-1* og *sel-12*. For uttrykket i gjær er promoterne *ADH1* (konstitutiv) (Vlckova et al. (1994) *Gene*, 25(5), 472-4), *GAL1* (kondisjonelt induserbar) (Selleck et al. (1987) *Nature* 325, 173-7), *MET3* (kondisjonell) (Cherest et al. (1987) *Mol Gen Genet* 210, 307-13) og *MET25* (cf. for eksempel, Kerjan et al. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14(20), 7861-71) passende. I
20 *Drosophila* er det mulig å anvende for eksempel promoterne *MT* (metallotionin), *Ac5* eller *Ds47* (alle: Invitrogen™ life technologies).

Helst blir en eukaryot celle brukt i prosessen, for eksempel en humancelle eller ikke-humancelle, for eksempel ape, hamster, mus, *Drosophila*, zebrafisk eller gjær. For
25 eksempel kan HeLa, HEK293, H4, SH-SY5Y, H9, Cos, CHO, N2A, SL-2 eller *Saccharomyces cerevisiae* celler brukes. I en bestemt utførelsesform i oppfinnelsen blir en *C. elegans* celle benyttet. Cellen kan være en bestanddel til et transgent, ikke-humant dyr. I en bestemt utførelsesform kan den transgene cellen være en bestanddel til en transgen *C. elegans*. Spesielt vedrører oppfinnelsen prosesser hvor gjærceller, for
30 eksempel fra stammen MaV203 (Invitrogen™ life technologies, Rockville, MD, USA) eller EGY 48 (OriGene Technologies, Inc. Rockville, MD, USA), ble anvendt.

Transgenet koder for et fusjonsprotein; dette er sammensatt av de delproteinene som kodes for av den første og den andre nukleotidsekvensen, og hvis det er passende videre
35 nukleotidsekvenser. Fusjonsproteinet inneholder dermed det første delprotein og det andre delprotein, og hvis det er passende, et videre delprotein. Det er imidlertid viktig at fusjonsproteinet ikke inneholder noe peptidmotiv som virker som et signal for endo-

eller eksocytose og/eller proteasekløyvningssete, unntatt for SEQ IDNR. 1. Kjente proteasekløyvningsseter er kjent for fagfolk fra proteasedatabaser, for eksempel MEROPS (Rawlings et al. (2002) MEROPS: proteasedatabasen. *Nucleic Acids Res.* **30**, 343-346).

5

Helst inneholder fusjonsproteinet ifølge den foreliggende oppfinnelsen ikke et proteasekløyvningssete som er et caspasekløyvningssete, for eksempel (IVL)ExD, spesielt VEVA, VEVD og i en annen utførelsesform inneholder fusjonsproteinet ifølge den foreliggende oppfinnelsen ikke videre et signalpeptid for endo- eller eksocytose som er et signal for APP internalisering, for eksempel NpxY eller Di-leucin spesielt, NPTY.

I en spesifikk utførelsesform har fusjonsproteinet aminosyresekvensen SEQ IDNR. 14. I tillegg til SEQ IDNR. 1 inneholder nevnte fusjonsprotein ikke noen (en eller flere) videre peptidmotiv som virker som et signal for endo- eller eksocytose (for eksempel APP internaliseringssignal) og/eller protease (for eksempel caspase) kløyvningssete.

Spesielt kan et transgen som har nukleotidsekvensen ifølge SEQ IDNR. 15 (SPC55GV TAG) benyttes i prosessen. I bestemte foretrukne utførelsesformer av prosessen, er transgenet tilstede i en vektor. Denne spesifikke utførelsesform i oppfinnelsen er også betegnet som SP-C55-Gal-4-VP16 (det vil si SPC55GV). I dette tilfellet blir et fusjonsprotein som består av signalpeptidet til APP, C55-fragmentet til APP, GAL4 og VP16 uttrykt. Dette protein som er lokalisert i det transmembrane domene kløyves innen C55-fragmentet og det andre delproteinet, det vil si delen av fusjonsproteinet som inneholder en del av C55-fragmentet, GAL4 og VP16 blir detektert ved hjelp av et reporterplasmid.

Ved siden av transgenkonstruksjonen SPC55GV, er også andre reporterkonstruksjoner mulige hvor for eksempel det transkripsjonsaktiverende domene kunne settes inn mellom transmembrandomene og cytosoldomene til SPC55 eller en Tag (for eksempel MYC, FLAG) på den N- eller C-terminale enden og mellom transmembran og cytosoldomene til SPC55.

Den videre kodende nukleotidsekvensen kan for eksempel kode for et protein som kan anvendes for deteksjonen av det andre delproteinet. Helst er derfor den videre kodende nukleotidsekvensen lokalisert i den 3' enden av den første nukleotidsekvensen. Den videre kodende nukleotidsekvensen koder for eksempel for et kimert protein eller et

35

annet protein som er konstruert fra en rekke domener, for eksempel et protein som inneholder et DNA-bindende domene og et transkripsjonsaktiverende domene. I en bestemt utførelsesform av oppfinnelsen koder den videre kodende nukleotidsekvensen for et protein som består av et GAL4-bindende domene og av det

5 transkripsjonsaktiverende domene til VP16 (GAL4-VP16, "GV"), og det videre delproteinene har helst da aminosyresekvensen SEQ IDNR. 7. I gjærceller kan det videre delproteinene også inneholde et LexA-bindende domene (for eksempel Lex A-VP16). Dette videre delproteinene er spesielt passende for prosesser hvor cellene i gjærstammen EGY48 anvendes.

10

Spesielt vedrører oppfinnelsen prosesser hvor celler som er kotransfektet med et reporterplasmid anvendes. Reporterplasmidet inneholder et reporterogen under kontrollen av en regulerbar promotor. For eksempel kan reportergenet kode for GFP og dets derivater, for eksempel EGFP (forsterket grønt fluoriserende protein), EBFP, EYFP,

15 d2EGFP, GFPuv eller Luciferase (for eksempel Promega, Mannheim, Tyskland), CAT (for eksempel Promega), SEAP (for eksempel Clontech), β Gal (for eksempel Clontech), korallvev fluoresserende protein (RCFP, Clontech) eller apoptoseinduserende faktorer, for eksempel Fas, TNF-R1, døddomene og homologer (Tartaglia et al. (1993) Cell 74, 845-53), ced3, ced4, ced9. Som en regulerbar promotor kan reporterplasmidet

20 inneholde en minimal promotor, for eksempel et GAL4-bindende sete i kombinasjon med den minimale promotoren til HIV, til CD α -promotoren eller til mec7-promotoren. Valget av den passende regulerbare promotoren er avhengig av det transkripsjonsaktiverende domene som benyttes.

25

En bestemt utførelsesform av oppfinnelsen vedrører implementeringen av prosessen, hvor cellene som anvendes er gjærceller. Som et alternativ til gjærekspresjonsvektoren pDBTrp (Invitrogen™ life technologies, The Netherlands, Cat. No. 10835023) som i en spesiell utførelsesform av oppfinnelsen en MET-25-promotor er integrert inn i (SEQ IDNR. 10), så kan et stort antall andre ekspresjonsvektorer med forskjellige promotere

30 (for eksempel den induserbare GAL1-promotoren, den konstitutivt aktive ADH1-promoter) og med forskjellige seleksjonsmarkører (ADE, LEU, TRP, HIS, LYS, PHE) selekteres.

35

En bestemt utførelsesform ved oppfinnelsen vedrører anvendelsen av gjærceller som inneholder GAL4- eller LexA-induserbare reportergener enten stabilt integrert i deres genom eller ekstrakromosomalt. I disse utførelsesformer blir helst gjærstammene

MaV203 (Invitrogen™ life technologies Inc., Rockville, MD, USA) or EGY48 (OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) anvendt.

En bestemt utførelsesform av prosessene vedrører anvendelsen av en celle som er tilleggstransfektet med en videre rekombinant vektor. Helst har cellen som er anvendt i disse utførelsesformene normalt ikke eller knapt noen endogen γ -sekretase eller endogen γ -sekretaseaktivitet, og er ikke detekterbar ved å anvende de ovenfor nevnte prosessene. Denne celle kan benyttes transformert med en videre vektor hvor en nukleotidsekvens – helst et cDNA – finnes som koder for en γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase, eller en γ -sekretaselignende proteinase. For eksempel kan et cDNA-bibliotek benyttes. Denne utførelsesform av prosessen kan så anvendes blant annet for å identifisere en γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase eller en γ -sekretaselignende proteinase eller et cDNA som koder for en γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase, eller en γ -sekretaselignende proteinase. cDNA-biblioteker som kan benyttes til å søke for en γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase eller en γ -sekretaselignende protease kan lages fra celler eller vev fra enhver organisme, for eksempel B-celler, neuroner, gliaceller, hippokampus, hel hjerne, placenta, nyre. Helst blir cDNA laget fra virveldyr (for eksempel hamster, rotte, mus, hund, ape, menneske), spesielt fra humane celler eller humane vev.

I tilfelle med celler, som uten transfeksjon ikke hemmer γ -sekretaseaktivitet, men som etter tranfeksjon med et cDNA-bibliotek som utviser γ -sekrataseaktivitet, kodes det DNA som er tilstede i cellen for en γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase eller en γ -sekretaselignende proteinase. Dette cDNA kan isolere ved hjelp av kjente prosesser fra celler, som utviser denne oppførsel, og kan videre analyseres ved hjelp av kjente fremgangsmåter.

Foreliggende beskrivelse omtaler også et transgen som koder for et fusjonsprotein, og som inneolder de følgende bestanddelene:

- a) en første nukleotidsekvens som koder for et protein som inneholder aminosekvensen GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ IDNR. 1),
- b) en andre nukleotidsekvens som koder for et signalpeptid i den 5' enden av den første nukleotidsekvensen,
- c) en promoter og
- d) minst en videre nukleotidsekvens i den 5' enden av den første nukleotidsekvensen som koder for et DNA-bindende domene og for et transkripsjonsaktiverende domene, hvor ved siden av SEQ IDNR. 1 nevnte

fusjonsprotein ikke inneholder et eller flere peptid som virker som et signal fra endo- eller eksocytose og/eller proteasekløyningssete.

Helst koder den første nukleotidsekvensen for APP eller en del av det, som ikke
5 omfatter i tillegg til SEQ IDNR. 1 noen videre peptidmotiv som virker som et signal for endo- eller eksocytose og/eller proteasekløyningssete. Transgenet kan for eksempel ha nukleotidsekvensen SEQ IDNR. 15.

Transgenet kan være tilstede i en passende vektor, for eksempel pcDNA 3.1 + eller
10 pDBTrp. En annen utførelsesform i beskrivelsen er en prosess som vedrører anvendelsen av transgenet og/eller av vektoren for produksjonen av en transgen celle hvorved valgfritt, nevnte transgene celle anvendes for å bli en bestanddel av en ikke-human organisme. Passende som en in vivo-reporterorganisme. For eksempel kan nevnte transgen og/eller vektor anvendes for produksjonen av en transgen *C. elegans*. I
15 en annen utførelsesform så blir nevnte transgen og/eller vektoren anvendt for produksjonen av transgene gjærceller, for eksempel *S. cerevisia*.

Beskrivelsen omtaler også en prosess for produksjonen av en transgen ikke-human organisme, for eksempel av en transgen *C. elegans* hvor nevnte transgen og/eller en
20 vektor som omfatter nevnte transgen mikroinjiseres inn i gonadene til organismen, for eksempel til en *C. elegans*. Oppfinnelsen vedrører også en celle som inneholder et transgen ifølge oppfinnelsen, og en transgen *C. elegans* som inneholder nevnte transgen. Oppfinnelsen vedrører også en celle, spesielt en gjær celle, som inneholder nevnte transgen i oppfinnelsen, helst tilstede i en passende vektor. Videre omtaler beskrivelsen
25 spesielt celler, helst gjærceller, som inneholder transgenet og et cDNA-bibliotek, ”resp”., er passende for å bli underlagt et cDNA-ekspresjonsbibliotek (cDNA-bibliotek).

Beskrivelsen omtaler anvendelsen av nevnte transgene eller rekombinante celler, helst celler fra gjær eller *C. elegans* i en prosess for bestemmelse eller for identifisering av
30 γ -sekretase, cDNA som koder for γ -sekretase, cDNA som koder for et subenhetsprotein av γ -sekretase, cDNA som koder for en γ -sekretaselignende proteinase, eller aktiviteten til γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase, eller en γ -sekretaselignende protease, anvendelsen av nevnte celler i en prosess for identifisering av hemmere til γ -sekretaseaktiviteten (γ -sekretase, en subenhetsprotein av γ -sekretase eller en γ -
35 sekretaselignende proteinase) og prosesser av dem.

Spesielt omtaler beskrivelsen prosesser for identifikasjonen av substanser (effektorer), som modulerer (det vil si hemmer, senker, øker eller forandrer) aktiviteten til en γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase eller en γ -sekretaselignende proteinase, prosessen inneholder de følgende trinnene:

- 5 1. produksjon av en transgen ikke-human organisme, for eksempel av en transgen *C. elegans* eller *Saccharomyces cerevisia* eller av en transgen celle, den transgene ikke-humane organismen eller den transgene cellen som inneholder transgenet,
- 10 den transgene ikke-humane organismen eller den transgene cellen som videre inneholder et reporterplasmid, reporterplasmidet bærer et proteinbindingssete, en minimal promoter og et reportergen og,
- 15 hvis det er passende et cDNA som koder for γ -sekretasen, subenhetsprotein til γ -sekretasen eller γ -sekretaselignende proteinase hvor den transgene ikke-humane organismen eller den transgene cellen uttrykker transgenet, og hvis det er passende, γ -sekretasen, et subenhetsprotein av γ -sekretasen eller en γ -sekretaselignende protease som kodes for cDNA;
- 20 2. den transgene ikke-humane organismen eller den transgene cellen blir inkubert med en testsubstans som skal undersøkes; og
3. mengden av det andre delvise protein blir detektert.

25 Beskrivelsen omtaler også en prosess for identifikasjonen av effektorer av γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase eller en γ -sekretaselignende proteinase hvor

1. et transgen ifølge oppfinnelsen lages/brukes;
2. nevnte transgen og et reporterplasmid, og hvis det er passende, et cDNA som koder for en γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase eller en γ -sekretaselignende proteinase blir integrert inn i genomet til en celle og fusjonsprotein som kodes for av det nevnte transgenet, og hvis passende, γ -sekretasen, subenhetsprotein til γ -sekretasen, eller γ -sekretaselignende proteinase som kodes for av cDNAet blir uttrykt i nærværet av en substans som skal undersøkes;
- 30 3. fusjonsprotein er
- 35

- a) kløyyet innen aminosyresekvensen SEQ IDNR. 1 av γ -sekretasen som er tilstede i cellen slik at
- b) et første delvis protein som inneholder aminosyresekvensen GAIIGLMVGGVV (SEQ IDNR. 2) og et andre delvis protein som inneholder aminosyresekvensen VIVITLVML (SEQ IDNR. 3) dannes; og
4. nevnte andre delvise protein blir bestemt kvalitativt eller kvantitativt.

10 Beskrivelsen omtaler også prosesser for identifikasjon av substanser som hemmer aktiviteten av en γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase eller en γ -sekretaselignende proteinase hvor et transgen som koder for et protein som inneholder et signalpeptid og SEQ IDNR. 1 uttrykkes i nærværet av en substans som skal undersøkes og av et reporterplasmid, og effekten av substansen som skal undersøkes på
15 mengden av andre delvise protein dannet blir bestemt, det andre delproteinene inneholder aminosyresekvensen VIVITLVML (SEQ IDNR. 3).

Beskrivelsen omtaler også hemmere av en γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase eller en γ -sekretaselignende proteinase som er identifisert ved prosesser i
20 oppfinnelsen.

For eksempel kan prosessene anvendes for eksempel sammen med C55-Gal 4-VP16-systemet (det vil si et fusjonsprotein som består av C55, GAL4 og VP16 eller ved å anvende en nukleinsyre som koder for et korresponderende fusjonsprotein) for:

- 25 1. Identifikasjon og bestemmelse (kvalitativ og/eller kvantitativ) av aktiviteten til en γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase eller en γ -sekretaselignende proteinase.
- 30 2. Identifikasjon av γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase eller en γ -sekretaselignende proteinase i forskjellige vev, celler og organismer eller arter. Identifikasjon og isolering av cDNA'ene det dreier seg om som koder for γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase, eller en γ -sekretaselignende proteinase og den videre anvendelse av cDNA'ene.
- 35 3. In vivo-screening for eksempel i gjærceller (for eksempel *Saccharomyces cerevisiae*), i *C. elegans* eller i cellekultur, gjør det mulig å bestemme aktiviteten av γ -sekretasen, et subenhetsprotein av γ -sekretasen, av et subenhetsprotein av γ -

sekretasen eller av en γ -sekretaselignende proteinase uten å anvende immunbiologiske fremgangsmåter.

4. Anvendelse av prosessen i foreliggende oppfinnelse for identifikasjon og karakteriseringen av substanser, for eksempel farmakologisk aktive forbindelser, som modulerer den enzymatiske eller biologiske aktiviteten av γ -sekretasen, av et subenhetsprotein av γ -sekretasen, eller av en γ -sekretaselignende protease, for eksempel effekter av (hemmere, aktivatorer, modulatorer) av γ -sekretasen, av et subenhetsprotein av γ -sekretasen, eller av en γ -sekretaselignende proteinase. Spesielt kan denne prosess benyttes i en HTS (høy kapasitetsscreening). Ved anvendelse av HTS-analysesystemer, kan substanser identifiseres som kan benyttes for behandlingen av Alzheimers sykdom og/eller for preventiv behandling.
5. Undersøkelse på eller i sammenheng med Alzheimers sykdom, vil for eksempel fremme en dypere forståelse av mutert APP og fragmenter av disse, eller funksjonen av membranbaserte proteaser.
6. De beskrevne fusjonsproteiner/transgener, for eksempel C55 i SP-C55-Gal 4-VP16, kan erstattes av andre fragmenter ifølge oppfinnelsen, og γ -sekretasen, et subenhetsprotein av γ -sekretasen eller en γ -sekretaselignende proteinase, dets aktivitet og regulering kan undersøkes ved hjelp av prosessene.

En annen utførelsesform ifølge foreliggende beskrivelse er en farmasøytisk sammensetning som omfatter en farmasøytisk aktiv forbindelse som hemmer aktiviteten av en γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase eller en γ -sekretaselignende proteinase som er blitt identifisert ved hjelp av en prosess som beskrevet ovenfor.

En videre utførelsesform ifølge foreliggende beskrivelse er en prosess for å lage en farmasøytisk sammensetning som omfatter en prosess som beskrevet, og å formulere den nevnte identifiserte farmasøytiske aktive forbindelsen.

Enda en videre utførelsesform ifølge foreliggende beskrivelse er en prosess for å lage et farmasøytika som omfatter a) en prosess som beskrevet og b) å blande den identifiserte farmasøytiske aktive forbindelse med et farmasøytisk uvirksom uorganisk og/eller organisk hjelpemiddel.

Enda en annen utførelsesform ifølge foreliggende beskrivelse er et testkit for å detektere aktiviteten til γ -sekretase, til et subenhetsprotein av γ -sekretase eller til en γ -sekretaselignende proteinase, som omfatter transgene, vektoren eller celle som beskrevet ovenfor.

5

Figur 1: Figur 1 viser det amyloid forløperprotein (Isoform APP695 og Isoformene APP770 eller APP751) og sekretasekløvningsprodukter.

Figur 2: Viser skjematisk prinsippet som prosessene er basert på: β -sekretasekløvningssete i den N-terminale enden; γ -sekretasekløvningssete i det transmembrane domene; C100 = C100-fragment til APP; GAL4-VP16 = DNA-bindende domene, transkripsjonsaktiverende domene (som består av DNA-bindende domene og transkripsjonsaktivator), som binder seg til det proteinbindende domene på DNA'et på reporterplasmidet.

15

Figur 3: Konstruksjon av ekspresjonsplasmidene SP-C100-GAL4-VP16: aa = aminosyrer; restriksjonskløvningssteder Sac I, Hind III og Kpn I indikerer posisjonen til kløvningssetet på plasmidet.

Figur 4: Ekspresjonsplasmid pDBTrp-MET25-SP-C100-GAL4-VP16: konstruksjon av ekspresjonsplasmidet for ekspresjonen av transgenet i gjær.

EKSEMPLER

Eksempel 1:

Konstruksjon av ekspresjonsplasmidet pcDNA3.1+ som omfatter SP-C100-GAL4/VP16

Plasmidet koder for APP-signalpeptidet (SP) som er fusert til det C-terminale 100-aminosyreresiduet til APP (C100). C100 begynner med den N-terminale enden av A β -peptidet og slutter med den C-terminale enden av APP. Det må i tillegg kløyves av γ -sekretasen for å frigjøre A β -peptidet.

GAL4/VP16 (SEQ IDNR. 7) ble fusert til den C-terminale enden av SP-C100 (SEQ IDNR. 6). GAL4/VP16 omfatter de første 147 aminosyreresiduen til gjærtranskripsjonsaktivatoren GAL4 og de 78 C-terminale aminosyreresiduen til VP16, en transkripsjonsaktivator fra herpes simplex-viruset. Som et fusjonsprotein tar

35

GAL4-fragmentet over funksjonen av DNA-bindingen, mens VP16-fragmentet aktiverer transkripsjonen (Sadowski et al., 1988).

pcDNA3.1+ (Invitrogen™ life technologies, Nederland, Cat.nr. V79020) tjener som plasmidvektoren.

5

Eksempel 2:

Konstruksjon av reporterplasmidet pGL2-MRG5-EGFP

Det pattedyrcellereporterplasmidet pGL2-MRG5 er pGL2 (Promega) hvor et cDNA-fragemt fra pMRG5 (Ikeda et al., 1998) som omfatter fem GAL4 DNA-bindingssete oppstrøms for det humane immundefisiente virus (HIV) core promoteren (Kretzschmar et al, 1994), er satt inn oppstrøms for luciferasereporter-genet i pGL2. For lettere deteksjon i cellekultur ble luciferasereporter-genet erstattet av genet for EGFP (forsterkeet grønt fluoriserende protein) skaffet tilveie fra vektoren pEGFP-N1 (Clontech Laboratories, Heidelberg).

15

Eksempel 3:

Co-transfeksjon av humane neuroblastomaceller.

Humane neuroblastomaceller SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) ble co-transfektet med begge plasmidene fra eksemplene 1 og 2 og deretter mikroskopisk analysert under stråling med lys ved bølgelengde 480 nm, hvor EGFP blir eksitert. Det var mulig å detektere EGFP-uttrykkende celler som utviste sterk grønn fluoressens. For å sikre at den grønne fluoressensen spesifikt er avhengig av ekspresjonen av EGFP ved reporterplasmidet, ble SH-SY5Y-celler transfektet bare med reporterplasmidet pGL2-MRG5-EGFP. I disse cellene var det ingen grønn fluoressens detekterbar. Uttrykket ble aktivert av GAL4-VP16, som forutsetter en proteolytisk frigjøring av GAL4/VP16 fra den C-terminale enden av SP-C100-GAL4/VP16.

25

Eksempel 4:

Anvendelse av C100-Gal4/VP16-systemet for deteksjonen av et cDNA som koder for en γ -sekretaseaktivitet i cDNA-biblioteker.

SP-C100-Gal4/VP16 ble klonet i gjærekspresjonsvektoren pDBTrp (Invitrogen™ life technologides, Nederland, Cat.nr. 10835023) under kontrollen av MET25-promoteren ved å erstatte delen av pDBTrp som inneholdt ADH-promoteren og GAL4DB-domener (posisjonert mellom CYH2-genet og det multiple kloningssetet) med et DNA-fragment

35

som inneholdt MET25-promoteren fra p415MET25 (Mumbert et al, 1994) oppstrøms for SP-C100-Gal4-VP16. Gjærstammen MaV203 (Invitrogen™ life technologies) ble transformert med denne konstruksjon. MaV203 er genetisk modifisert og inneholder tre GAL4-induserbare reportergener (URA3, HIS3, lacZ), som er stabilt integrert inn i
 5 genomet (Vidal et al., 1996). I MaV203 resulterte den proteolytiske frigjøringsen av GAL4/VP16-domenet fra SP-C100-Gal4-VP16-protein i aktiveringen av URA3 og HIS3 "read-out" som tillater vekst for plater som mangler uracil eller histidin.

Ekspresjonen av SP-C100-Gal4-VP16 cDNA i MaV203 resulterte bare i lav aktivitet av
 10 reporterne, slik at dette in vivo-funksjonelle analysesystem er passende for å screene for og deteketere ekspresjon av et cDNA for en γ -sekretase i et cDNA-bibliotek.

Eksempel 5:

15 Identifisering av γ -sekretaser ved å screene et humant B-celle cDNA-bibliotek.

Den rekombinante MaV203 gjærstammen fra eksempel 4 ble anvendt for formålet med å screene et humant B-celle cDNA-bibliotek (ATCC 87286; American Type Culture Collection, Manassas, USA; Elledge et al., 1991) for et cDNA som koder for et protein med γ -sekretaseaktivitet. Alternativt kan et humant hippocampal cDNA-bibliotek
 20 integrert inn i gjærekspresjonsvektorene p415-MET25 (Mumberg et al., 1994) eller p415-ADH1 (Mumberg et al., 1995) også benyttes for å screene etter et cDNA som koder for en γ -sekretase eller et protein som har γ -sekretaselignende aktivitet.

Eksempel 6:

25

Kloning av SP2-C100 og SP2-C100-GAL4/VP16.

Den kodende regionen for det humane signalpeptidet til SP-C100-GAL4/VP16 (som beskrevet i eksempel 1) ble erstattet med et signalpeptid utledet fra gjær SUC2-genet (SP2; SEQ IDNR. 12), som resulterer i en konstruksjon som koder for SP2-C100-
 30 GAL4/VP16 (SEQ IDNR. 19).

SP2-C100 ble konstruert med å oppformere den kodende regionen til den modne formen av C100 (uten signalsekvensen, jamfør SEQ IDNR. 4) med en 5' primer, som inkluderte den kodende sekvensen for SUC2-signalpeptidet (SEQ IDNR. 12) og en 3'
 35 primer som korresponderer til det naturlige stopkodonet (Kang et al., (1987)). For å fasilitere utbyggingen av signalpeptidet, ble primerne EH47 (SEQ IDNR. 23) og EH49 (SEQ IDNR. 24) designet slik at det resulterende PCR-produktet inneholdt et tilleggs

Nhel-sete som forbinder de kodende regionene for signalpeptidet og det modne peptidet.

EH47: 5'-GCTAGAATGCTTTTGTCAAGCTTTCCTTTTCCTTTTGGCTGGTTTTGC
AGCC AAAATATCTGCAGCGCTAGCTGATGCAGAATTCCGACATGAC-3'

5 EH49: 5'-CGGGATCCCTAGGCGCCGTTCTGCATCTGCTCAAAGAAC-3'.

SP2-C100-GAL4/VP16 ble skaffet tilveie ved hjelp av EcoR1-kløyving for å fjerne C100-fragmentet i SP2-C100 og erstatte det med C100-GAL4/VP16. Fragmentene ble klonet inn i gjærekspresjonsvektoren pDBTrp (InvitrogenTM life technologies,
10 Nederland, Catnr. 10835023) som inneholdt MET25-promoterens, som beskrevet i eksempel 4.

Eksempel 7:

15 **Kloning av SP2-C-BAL4/VP16-100**

For å skaffe tilveie konstruksjonen SP2-C-GAL4/VP16-100 (SEQ IDNR. 17), ble tre uavehengige PCR-reaksjoner utført ved å anvende de følgende primerne:

EH53: 5'-ACTATATCTAGAATGCTTTTGC-3'

20 EH54: 5'-TTCGATAGAAGACAGTAGCTTGCCAGATCTACCTTTTCTTCTTCAGCAT
CACCAA-3'

EH55: 5'-TTGGTGATGCTGAAGAAGAAAGGTAGATCTGGCAAGCTACTGTCTTCT
ATCGAA-3'

EH56: 5'-ATGATGAATGGATGTGTACTGGCCACTAGTACCCCCACCGTACTCGTC
25 AATT-3'

EH57: 5'-AATTGACGAGTACGGTGGGGTACTAGTGGCCAGTACACATCCATTC
ATCAT-3'

EH59: 5'-CGATAAGCTTGATATCGAATTC-3':

30 1) Ved å anvende SP2-C100 som et templat, ble ectodomene og transmembrandomene til C100 oppformert ved å anvende primerne EH53 (SEQ IDNR. 25) og EH54 (SEQ IDNR. 26) på en slik måte at PCR-produktet inneholdt også den 3' flankerende regionen som overlapper med den GAL4/VP16 kodende regionen.

2) Ved å anvende primerne EH55 (SEQ IDNO. 27) og EH56 (SEQ IDNO. 28), og GAL4/VP16 som DNA-templatet ble en PCR-reaksjon utført ved å identifisere den kodende regionen med 5'- og 3'-flankerende regioner som korresponderer til hver side av SP2-C100.

5

3) Det 3'segmentet til SP2-C100 som koder for det cytoplasmatiske domene til C100 ble oppformert ved å anvende primerne EH57 (SEQ IDNR. 29) og EH 59 (SEQ IDNR. 30), og resulterte i en 5' overlapp med den GAL4/VP16 kodende regionen. De resulterende PCR-produktene (på ca 200 bp, 720 bp og 100 bp) ble rensset og anvendt i en slutt-PCR i nærvær av EH53 og EH59 som korresponderer til de 5' og 3' endende til SP2-C100. Slutt-PCR-produktet på ca 1 000 bp blir klonet inn i en gjærekspresjonsvektor utledet fra pDBTrp (Invitrogen™ life technologies, Nederland, Catnr. 10835023) som inneholder MET25-promoteren, som beskrevet i eksempel 4.

15

Eksempel 8:

Kloning av SP3-C100, SP3-C100-GAL4/VP16 og SP3-C-GAL4/VP16-100.

For å lage de tre plasmidvektorene for ekspresjon av SP3-C100, SP3-C100-GAL4/VP16 (SEQ IDNR.21), og SP3-C-GAL4/VP16-100 (SEQ IDNR. 32) i pattedyrcellesystemer, så ble enten C100, C100-GAL4/VP16 eller C-GAL4/VP16-100 subklonet fra gjærekspresjonsvektorene i eksempel 6 eller 7 inn i den pattedyrekspresjonsvektoren pRc/CMV (Invitrogen, Catnr. V75020), som inneholder den kodende regionen for BM40-signalpeptidet (SP3; SEQ IDNR. 13). De kodende regionene til C100, C100-GAL4/VP16 eller C-GAL4/VP16-100) ble ligert i leseramme fra den SP3-kodende regionen ved det unike Nhe1-restriksjonssete som ble beskrevet i eksempel 6.

25

Eksempel 9:

30 Forbedring av ekspresjonen av C100-GAL4/VP16 i gjær.

Kvantifisering av ekspresjonsnivået til forskjellige konstruksjoner i råe lysater fra transformert gjær viste at ekspresjonen av SP-C100-GAL4/VP16 var veldig lav sammenlignet med lysater fra gjærceller transformert med vektorer som koder for fusjoner med gjær SUC2-signalpeptidet. For eksempel resulterte ekspresjon av SP2-C100-GAL4/VP16 i den sterke ekspresjonen av et spesifikt bånd av den forventede størrelsen. Imidlertid kunne også bånd med høyere elektroforetisk mobilitet detekteres ved immunblotting, noe som indikerer ikke spesifikk degradering av det rekombinante

35

proteinet i gjær. Stabiliteten til proteinet ble forbedret i tilfellet med C-GAL4/VP16-100 (se nedenfor) hvor GAL4/VP16-domene ble satt inn i leseramme i C00, nær γ -sekretasekløyvingssete. Begge fusjonsproteiner ga ekspresjonsnivåer som var sammenlignbare med konstruksjonen som koder for C100 uten GAL4/VP16, noe som indikerer at de to forskjellige fusjonene mellom C100 og GAL4/VP16 ikke interfererte med proteinekspresjon.

Eksempel 10:

10 **Forbedring av bakgrunnen i gjær.**

Den økede ekspresjonen av C100-GAL4/VP16 som skyldes utbyttningen av signalpeptidene korrelerte med en sterk økning i ikke-spesifikk aktivering av URA3, HIS3 og lacZ reportersystemene i gjærstammene MaV203. Fordi gjær mangler γ -sekretaseaktivitet var dette mest sannsynlig på grunn av ikke-spesifikk prosessering av C100-GAL4/VP16 av cellulære proteaser og frigjøringen av aktiv GAL4/VP16.

Ved å flytte GAL4/VP16-domene nærmere γ -sekretasekløyvingssete ble den ikke-spesifikke proteolytiske kløyvingen som ble detektert med C100-GAL4/VP16 ved seter mellom transmembrandomene til C100 og den aminoterminalen til GAL4/VP16-domene essensielt eliminert.

Kløyvning av de forskjellige konstruksjonene ble testet i MaV203 ved å undersøke GAL4/VP16-avhengig aktivering av reportersystemene. Transformering av MaV203 med SP-C100-GAL4/VP16 utviste en Ura⁺, His⁻fenotype (jmfør eksempel 4). Øking av ekspresjonsnivåene ved å erstatte SP-signalpeptidet med SP2-peptidet (for å gi SP2-C100-GAL4/VP16) resulterte i en sterk aktivering av alle "read-outs" til et nivå som lignet det som ble detektert i den positive kontrollen, MaV203 som konstitutiv uttrykker fullengde GAL4-protein (kodet av plasmid pC11; Clontech Laboratories).

I motsetning til dette utviste MaV203-celler som uttrykker SP2-C-GAL4/VP16-100, som uttrykkes ved nivåer som er sammenlignbare med SP2-C100-GAL4/VP16, en ura⁻, His⁻fenotype som også ble utvist av MaV203 som var transformert med en tom vektorkontroll.

Derfor kan SP2-C-GAL4/VP16-100 uttrykkes sterkt i gjær, men fremdeles vise veldig lav ikke-spesifikk aktivering av de GAL4-avhengige reporterne. Høynivåekspressjon av SP2-C-GAL4/VP16-100-proteinet, kombinert med en lav bakgrunn av ikke-spesifikk

kløyving/reporteraktivering, er en forutsetning for et "read-out"-system med et overraskende optimalisert signal til bakgrunnsratio.

Eksempel 11

5

Prosessering av SP3-C-GAL4/VP16-100 med γ -sekretase i pattedyrceller.

For å demonstrere at SP3-C-GAL4/VP16-100-protein uttrykt i pattedyrceller prosesseres korrekt av γ -sekretaseaktivitet, ble SP3-C-GAL4/VP16-100 transfektert inn i pattedyrceller som har vært vist å uttrykke γ -sekretaseaktivitet endogent (Haass et al., 10 1992). For ekspresjon i pattedyrceller ble signalpeptidet i SP2-C-BAL4/VP16-100 erstattet som beskrevet i eksempel 8, med et pattedyrsignalpeptid utledet fra det basale membranproteinet BM40, som er kjent for høyt nivåekspresjon (SP3; SEQ IDNR. 13). Prosessering av γ -sekretase ble målt ved å kvantifisere sekresjonen av A β i dyrkningsmediet. Det utskilte A β ble detektert ved hjelp av en sandwich ELISA ved å 15 anvende monoklonale antistoffer 6E10 og biotinyllert 4G8 (Senetec PLC, Napa, California, USA; jamfør Kim et al., 1990) som henholdsvis fangings- og deteksjonsantistoffer.

Etter transfeksjon med SP3-C100 ble en åtte gangers økning i A β -sekresjon observert 20 sammenlignet med den tomme vektorkontrollen. Sender transfektert med SP3-C100-GAL4/VP16 eller SP3-C-GAL4/VP16-100 utskilte lignende mengder av A β , noe som indikerer at verken den C-terminale eller den juktamembranfusjonen av GAL4/VP16 interfererer med proteolytisk prosessering ved γ -sekretase.

25 **Eksempel 12:**

Transkripsjonell aktivering av GAL4/VP16-avhengig reporter gen ved C-Gal4/VP16-100 uttrykt i pattedyrceller.

Prosessering av C100-GAL4/VP16 og C-GAL4/VP16-100 ved γ -sekretase resulterte i 30 frigjøringen av et polypeptid som inneholdt GAL4/VP16 og tilleggsaminoacidsyrer fra flankerende deler av C100. SP3-C100-GAL4/VP16 og SP3-C-GAL3/VP16-100 ble kotransfektet med det pattedyrreporterplasmidet pGL2-MRG5-EGFP (Ikeda et al., 1998) beskrevet i eksempel 2, som inneholder fem GAL4 DNA-bindende seter oppstrøms for den humane immundefisiente virus (HIV) kjernepromoteren og cDNA'et 35 som koder for EGFP. Kotransfeksjonen av pGL2-MRG5-EGFP med GAL4/VP16-inneholdende fusjonene resulterte i tilstedeværelsen av GFP-positive celler i begge tilfeller.

Eksempel 13:**Konstruksjon av pattedyrekspresjonsplasmid SP3-C55-GAL4/VP16.**

Konstruksjoner som inneholder C100-sekvensen til APP og GAL4/VP16 inneholder
 5 begge kløyvningsseter for γ -sekretase og et kløyvningssete for caspaselignende
 proteaser. For å unngå at en uspesifikk caspaselignende aktivitet kunne køyve SP3-
 C100-GAL4/VP16 mellom det autentiske γ -sekretasesete og GAL4/VP16-domene for å
 frigjøre GAL4/VP16 og aktivere reportersystemet i pattedyrceller, ble det 45 aminosyre
 C-terminale segmentet til C100 som fantes i SP3-C100-GAL4/VP16, som koder for det
 10 cytoplasmatiske domene til APP, slettet. Fjerning av de C-terminale 45-aminosyrene i
 C100 eliminerer også et "internaliseringssignal"peptid i den C-terminale enden av APP
 som dirigerer endocytosen av APP etter å ha blitt satt inn i plasmamembranen.

Pattedyrekspresjonsplasmid SP3-C55-GAL4/VP16 omfatter dermed BM40-
 15 signalpeptidet (SEQ IDNR. 13), de N-terminale 55 aminosyreresiduene (C55; SEQ
 IDNR. 6) til APP-C100 og GAL4/VP16. C55 begynner med den N-terminale enden av
 A β -peptidet og slutter med det transmembrane domene til APP. I SP3-C55-
 GAL4/VP16-protein er bare kløyvningssete for γ -sekretase tilstede. C55 omfatter γ -
 sekretasekløyvningssete og må kløyves av β -sekretase for å frigjøre A β -peptidet og
 20 GAL3/VP16. Fordi det endocytiske internaliseringssignalpeptidet ikke er tilstede i SP3-
 C55-GAL4/VP16, vil videre bare γ -sekretase som katalyserer kløyvninger
 plasmamembranassosiert C55-GAL4/VP16 frigjøre A β -peptid og aktivere
 GAL4/VP16-avhengig transkripsjon av reportersystemet.

Ekspresjonsplasmid ble utledet fra vektoren SP3-C-GAL4/VP16-100 ved
 introduksjonen av et stoppkodon (TAG) etter GAL4/VP16-sekvensen. Dette ble utført
 ved å erstatte Hpa1-Cla1-fragmentet i SP3-C-GAL4/VP16-100 med et DNA-fragment
 laget ved PCR ved å anvende SP3-C-GAL4/VP16-100 som DNA-templatet, en 5'
 primer oppstrøms for det unike Hpa1-sete i GAL4/VP16 og en 3' primer (5'-
 30 CCATCGATTTTCTAACCCCAACCGTA-3'; SEQ IDNR. 31) som introduserer et
 TAG-stoppkodon (understrek) og et Cla1-restriksjonssete i den C-terminale enden av
 GAL4/VP16 åpne leseramme.

Eksempel 14:**Stabile transfikterte HEK293-celler.**

HEK293-celler (Human Embryonisk nyrecellelinje, (ATCC)) ble cotransfektet med
5 plasmidet SP3-C55-GAL4/VP16 og luciferasereporterplasmidet PGL2-MRG5
(beskrevet i eksempel 2). Deretter ble stabile cellelinjer selektert ved å inkubere med
400 µg/ml geneticin (GibcoBRL) for å selektere for Neomycinresistente kloner og
deretter karakterisere for stabil ekspresjon av SP3-C55-GAL4/VP16 og luciferase.

Eksempel 15:**Transient transfeksjon av HEK 293-celler.**

HEK293-celler ble kotransfektet med SP3-C55-GAL3/VIP16-vektoren (0.03 µg) og
pGL2-MRG5-luciferasereportervektoren (1 µg) i multibrønn 12 plater.

15

Forbindelsene DPAT (fra Elan Pharmaceuticals; Dovey et al., 2001) og L-685,458 (fra
Merck Pharmaceuticals; Shearman et al., 2000), begge kjente γ -sekretasehemmere,
hemmet doseavhengig luciferaseaktivitet og A β -produksjon og utviste en IC₅₀ på
henholdsvis 14nM (DAPT) og 19nM (L-685,458), respektivt.

20

Luciferaseaktivitet ble kvantifisert ved Bright-Glo Luciferase Assay kittet (Promega).
A β i cellemediet ble kvantifisert med ELISA ved å anvende antistoffene 4G8 og 6E10
(fra Senetek), som beskrevet i eksempel 11. Disse antistoffer er spesifikke for
aminosyrene 17-24 (4G8) og 1-17 (6E10) i A β -peptidet.

25

I transiente transfeksjonsekspirerimenter ble A β også identifisert ved immunpresipitering
og ved immunblotting. Begge fremgangsmåter identifiserte et 4 kDa-bånd som
korresponderer til A β -peptid.

Eksempel 16:**Farmakologisk karakterisering av de stabilt transfektete HEK293-celler.**

En klon med HEK293-celler som stabilt uttrykker både SP3-C55-GAL4/VP16 og
MRG5-luciferasekonstruksjonene ble identifisert ifølge eksempel 14. Denne celleklon
35 ble anvendt for å undersøke responsen til det stabilt transfektete
pattedyrcelleanalyse-systemet til DAPT (fra Elan Pharm.; Dovey et al., 2001), og L-
685,458 (fra Merck Pharm.; Shearman et al., 2000),. begge forbindelser utviste

doseavhengig hemming av Luciferaseaktivitet (24 timers behandling) med en IC_{50} på henholdsvis 230nM (DAPT) og 130nM (L-685,458).

Eksempel 17:

5

Identifikasjon av hemmere til γ -sekretase.

For identifikasjonen av γ -sekretasehemmere, ble stabilt dobbelttransfekterte HEK293-celler (se eksempel 14) inkubert i multibrønns 96-plater, i nærværet av forbindelsen eller forbindelsene som skulle undersøkes (for eksempel sammensatt bibliotekscreening
10 ved en konsentrasjon på 10 μ M eller mindre i analysen, og luciferaseaktivitet ble bestemt 24 timer senere. Luciferaseaktivitet kan kvantifiseres med luciferaseanalyse-systemkittet (Promega), Brigh-Glo Luciferaseanalysekittet (Promega) eller ved hjelp av andre fremgangsmåter for luciferasekvantifisering. En nedgang i luciferaseaktiviteten reflekterer en nedgang i γ -sekretaseaktivitet.

15

Referanser:

- Dovey et al. (2001) *J. Neurochem.* 76, 173.
 Elledge et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1731.
 20 Estus et al. (1992) *Science* 255, 726.
 Haass et al. (1992) *Nature* 359, 322.
 Heijne et al. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14(11), 4683-4690.
 Hilbich et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 218, 149.
 Ikeda et al. (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18, 10.
 25 Kang et al. (1987) *Nature* 325, 733.
 Kim et al. (1990) *Neurosci. Res. Comm.* 7, 113.
 Kretzschmar et al. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 3927.
 Maruyama et al. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 1517.
 Mattson (2003) *Nature* 422, 385.
 30 Mumberg et al. (1994) *Nucl. Acids Res.* 22, 5767.
 Mumberg et al. (1995) *Gene* 156, 119.
 Rumble et al. (1989), *N. Engl. J. Med.* 320, 1446.
 Sadowski et al. (1988) *Nature* 335, 563.
 Scheuner et al. (1996), *Nature Medicine* 2, 864.
 35 Shearman et al. (2000) *Biochemistry* 39, 8698.
 Simons et al. (1996) *J. Neurosci.* 16(3), 899-908.
 Suzuki et al. (1994) *Science* 264(5163), 1336-1340.

Vidal et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10315.

Yankner et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 9020.

For generelt rekombinant DNA-arbeid:

- 5 Sambrook, J., Fritsch, E. F., og Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. utg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

For gjærarbeid (DNA-transformering):

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A.,
10 og Struhl, K. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, s. 13.7.1-13.7.2, Greene Publishing Associates/Wiley-Interscience, New York

For C. Elegans-arbeid (transgener):

- Mello, C. og Fire, A. (1995) DNA-transformering. I: Epstein, H.F.
15 og Shakes, D.C., ed. Caenorhabditis elegans: Modern Biological Analysis of an Organism. Methods in Cell Biology, Vol. 48. Academic Press, San Diego, CA, s. 451-482.

SEQ IDNR. 1 (APP-fragment)

- 20 GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML

SEQ IDNR. 2 (APP-fragment (første delvise protein))

GAIIGLMVGGVV

- 25 SEQ IDNR. 3 (APP-fragment (andre delvise protein))

VIVITLVML

SEQ IDNR. 4 (C100-fragment)

- LDAEFRHDSG YEVHHQKLVF FAEDVGSNKG AIIGLMVGGV VIATVIVITL
30 VMLKKKQYTS IHHGVVEVDA AVTPEERHLS KMQQNGYENP TYKFFEQMQN

SEQ IDNR. 5 (Signalpeptid til humant APP (SP))

MLPGLALFLL AAWTARA

- 35 SEQ IDNR. 6 (C55-fragment)

LDA EFRHDSGYEV HHQKLVFFAE DVGSNKGAI
GLMVGGVVIA TVIVITLVML KK

SEQ IDNR. 7 (GAL4-VP16)

MKLLSSIEQA CDICRLKCLK CSKEKPKCAK CLKNNWECRY SPKTKRSPLT
 RAHLTEVESR LERLEQLFLL IFPREDLDMI LKMDSLQDIK ALLTGLFVQD
 NVNKDAVTDR LASVETDMPL TLRQHRISAT SSSEESSNKG QRQLTVSPEF
 5 PGIWAPPTDV SLGDELHLDG EDVAMAHADA LDDFDLDMLG DGDSPGPGFT
 PHDSAPYGAL DMADFEFEQM FTDALGIDEY GG

SEQ IDNR. 8 (SP-C100-GAL4-VP16)

GGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTT
 10 TTGCGCTGCTTCGCGATGTAC
 GGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATC
 AATTACGGGGTCATTAGTTC
 ATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCC
 TGGCTGACCGCCCAACGACC
 15 CCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG
 GACTTTCATTGACGTCAAT
 GGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA
 TATGCCAAGTACGCCCCCTA
 TTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGA
 20 CCTTATGGGACTTTCCTACTT
 GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTG
 GCAGTACATCAATGGGCGTG
 GATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAA
 TGGGAGTTTGTTTTGGCACC
 25 GCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGA
 ACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACC
 CAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTCACAGCTAGCGCA
 CTCGGTGCCCCGCGCAGGGTCGCGATGCTGCCCGGTTTGGCACTGTTCTTGC
 TGGCCGCCTGGACGGCTCGGGCGCTGGATGCAGAATTCCGACATGACTCAG
 30 GATATGAAGTTCATCATCAAAAATTGGTGTTCTTTGCAGAAGATGTGGGTTC
 AAACAAAGGTGCAATCATTGGACTCATGGTGGGCGGTGTTGTCATAGCGAC
 AGTGATCGTCATCACCTTGGTGATGCTGAAGAAGAAACAGTACACATCCAT
 TCATCATGGTGTGGTGGAGGTTGACGCCGCTGTCACCCAGAGGAGCGCCA
 CCTGTCCAAGATGCAGCAGAACGGCTACGAAAATCCAACCTACAAGTTCTT
 35 TGAGCAGATGCAGAACGCGCGGGGTACCCCGGCG ATGAAGC
 TACTGTCTTC TATCGAACAA GCATGCGATA TTTGCCGACT TAAAAAGCTC
 AAGTGCTCCA AAGAAAAACC GAAGTGCGCC AAGTGTCTGA

AGAACAACTG GGAGTGTCGC TACTCTCCCA AAACCAAAAG GTCTCCGCTG
 ACTAGGGCAC ATCTGACAGA AGTGGAATCA AGGCTAGAAA
 GACTGGAACA GCTATTTCTA CTGATTTTTC CTCGAGAAGA CCTTGACATG
 ATTTTGAAAA TGGATTCTTT ACAGGATATA AAAGCATTGT TAACAGGATT
 5 ATTTGTACAA GATAATGTGA ATAAAGATGC CGTCACAGAT AGATTGGCTT
 CAGTGGAGAC TGATATGCCT CTAACATTGA GACAGCATAG AATAAGTGCG
 ACATCATCAT CGGAAGAGAG TAGTAACAAA GGTCAAAGAC
 AGTTGACTGT ATCG CCGGAATTCCTGGGGATCTGGGC CCCCCGAC
 CGATGTCAGC CTGGGGGACG AGCTCCACTT AGACGGCGAG
 10 GACGTGGCGA TGGCGCATGC CGACGCGCTA GACGATTTTCG ATCTGGACAT
 GTTGGGGGAC GGGGATTCCC CGGGGCCGGG ATTTACCCCC CACGACTCCG
 CCCCTACGG CGCTCTGGAT ATGGCCGACT TCGAGTTTGA GCAGATGTTT
 ACCGATGCC TTTGGAATTGA CGAGTACGGT GGGTAG

15 SEQ IDNR. 9 (humant APP)
 AGTTTCCTCG GCAGCGGTAG GCGAGAGCAC GCGGAGGAGC GTGCGCGGGG
 GCCCCGGGAG
 ACGGCGGCGG TGGCGGCGCG GGCAGAGCAA GGACGCGGCG GATCCCACTC
 GCACAGCAGC
 20 GCACTCGGTG CCCC GCGCAG GGTGCGGATG CTGCCCGGTT TGGCACTGCT
 CCTGCTGGCC
 GCCTGGACGG CTCGGGCGCT GGAGGTACCC ACTGATGGTA ATGCTGGCCT
 GCTGGCTGAA
 CCCAGATTG CCATGTTCTG TGGCAGACTG AACATGCACA TGAATGTCCA
 25 GAATGGGAAG
 TGGGATTCAG ATCCATCAGG GACCAAACC TGCATTGATA CCAAGGAAGG
 CATCCTGCAG
 TATTGCCAAG AAGTCTACCC TGAAGTGCAG ATCACCAATG TGGTAGAAGC
 CAACCAACCA
 30 GTGACCATCC AGAACTGGTG CAAGCGGGGC CGCAAGCAGT GCAAGACCCA
 TCCCCACTTT
 GTGATTCCCT ACCGCTGCTT AGTTGGTGAG TTTGTAAGTG ATGCCCTTCT
 CGTTCCTGAC
 AAGTGCAAAT TCTTACACCA GGAGAGGATG GATGTTTGCG AAATCATCT
 35 TCACTGGCAC
 ACCGTCGCCA AAGAGACATG CAGTGAGAAG AGTACCAACT TGCATGACTA
 CGGCATGTTG

CTGCCCTGCG GAATTGACAA GTTCCGAGGG GTAGAGTTTG TGTGTTGCCC
ACTGGCTGAA
GAAAGTGACA ATGTGGATTC TGCTGATGCG GAGGAGGATG ACTCGGATGT
CTGGTGGGGC
5 GGAGCAGACA CAGACTATGC AGATGGGAGT GAAGACAAAG TAGTAGAAGT
AGCAGAGGAG
GAAGAAGTGG CTGAGGTGGA AGAAGAAGAA GCCGATGATG ACGAGGACGA
TGAGGATGGT
GATGAGGTAG AGGAAGAGGC TGAGGAACCC TACGAAGAAG CCACAGAGAG
10 AACCACCAGC
ATTGCCACCA CCACCACCAC CACCACAGAG TCTGTGGAAG AGGTGGTTTCG
AGTTCCTACA
ACAGCAGCCA GTACCCCTGA TGCCGTTGAC AAGTATCTCG AGACACCTGG
GGATGAGAAT
15 GAACATGCCC ATTTCCAGAA AGCCAAAGAG AGGCTTGAGG CCAAGCACCG
AGAGAGAATG
TCCCAGGTCA TGAGAGAATG GGAAGAGGCA GAACGTCAAG CAAAGAACTT
GCCTAAAGCT
GATAAGAAGG CAGTTATCCA GCATTTCCAG GAGAAAAGTGG AATCTTTGGA
20 ACAGGAAGCA
GCCAACGAGA GACAGCAGCT GGTGGAGACA CACATGGCCA GAGTGGAAAGC
CATGCTCAAT
GACCGCCGCC GCCTGGCCCT GGAGAACTAC ATCACCGCTC TGCAGGCTGT
TCCTCCTCGG
25 CCTCGTCACG TGTTCAATAT GCTAAAGAAG TATGTCCGCG CAGAACAGAA
GGACAGACAG
CACACCCTAA AGCATTTCGA GCATGTGCGC ATGGTGGATC CCAAGAAAGC
CGCTCAGATC
CGGTCCCAGG TTATGACACA CCTCCGTGTG ATTTATGAGC GCATGAATCA
30 GTCTCTCTCC
CTGCTCTACA ACGTGCCTGC AGTGGCCGAG GAGATTCAGG ATGAAGTTGA
TGAGCTGCTT
CAGAAAGAGC AAAACTATTC AGATGACGTC TTGGCCAACA TGATTAGTGA
ACCAAGGATC
35 AGTTACGGAA ACGATGCTCT CATGCCATCT TTGACCGAAA CGAAAACCAC
CGTGGAGCTC

CTTCCCGTGA ATGGAGAGTT CAGCCTGGAC GATCTCCAGC CGTGGCATTG
 TTTTGGGGCT
 GACTCTGTGC CAGCCAACAC AGAAAACGAA GTTGAGCCTG TTGATGCCCC
 CCCTGCTGCC
 5 GACCGAGGAC TGACCACTCG ACCAGGTTCT GGGTTGACAA ATATCAAGAC
 GGAGGAGATC
 TCTGAAGTGA AGATGGATGC AGAATTCCGA CATGACTCAG GATATGAAGT
 TCATCATCAA
 AAATTGGTGT TCTTTGCAGA AGATGTGGGT TCAAACAAAG GTGCAATCAT
 10 TGGACTCATG
 GTGGGCGGTG TTGTCATAGC GACAGTGATC GTCATCACCT TGGTGATGCT
 GAAGAAGAAA
 CAGTACACAT CCATTCATCA TGGTGTGGTG GAGGTTGACG CCGCTGTCAC
 CCCAGAGGAG
 15 CGCCACCTGT CCAAGATGCA GCAGAACGGC TACGAAAATC CAACCTACAA
 GTTCTTTGAG
 CAGATGCAGA ACTAGACCCC CGCCACAGCA GCCTCTGAAG TTGGACAGCA
 AAACCATTGC
 TTCACTACCC ATCGGTGTCC ATTTATAGAA TAATGTGGGA AGAAACAAAC
 20 CCGTTTTATG
 ATTTACTCAT TATCGCCTTT TGACAGCTGT GCTGTAACAC AAGTAGATGC
 CTGAACTTGA
 ATTAATCCAC ACATCAGTAA TGTATTCTAT CTCTCTTTAC ATTTTGGTCT
 CTATACTACA
 25 TTATTAATGG GTTTTGTGTA CTGTAAAGAA TTTAGCTGTA TCAAACACTAGT
 GCATGAATAG
 ATTCTCTCCT GATTATTTAT CACATAGCCC CTTAGCCAGT TGTATATTAT
 TCTTGTGGTT
 TGTGACCCAA TTAAGTCCTA CTTTACATAT GCTTTAAGAA TCGATGGGGG
 30 ATGCTTCATG
 TGAACGTGGG AGTTCAGCTG CTTCTCTTGC CTAAGTATTC CTTTCCTGAT
 CACTATGCAT
 TTAAAGTTA AACATTTTAA AGTATTTTCAAG ATGCTTTAGA GAGATTTTTT
 TTCCATGACT
 35 GCATTTTACT GTACAGATTG CTGCTTCTGC TATATTTGTG ATATAGGAAT
 TAAGAGGATA

CACACGTTTG TTTCTTCGTG CCTGTTTTAT GTGCACACAT TAGGCATTGA
GACTTCAAGC
TTTTCTTTTT TTGTCCACGT ATCTTTGGGT CTTTGATAAA GAAAAGAATC
CCTGTTCATT
5 GTAAGCACTT TTACGGGGCG GGTGGGGAGG GGTGCTCTGC TGGTCTTCAA
TTACCAAGAA
TTCTCCAAAA CAATTTTCTG CAGGATGATT GTACAGAATC ATTGCTTATG
ACATGATCGC
TTTCTACACT GTATTACATA AATAAATTAA ATAAAATAAC CCCGGGCAAG
10 ACTTTTCTTT
GAAGGATGAC TACAGACATT AAATAATCGA AGTAATTTTG GGTGGGGAGA
AGAGGCAGAT
TCAATTTTCT TTAACCAGTC TGAAGTTTCA TTTATGATAC AAAAGAAGAT
GAAAATGGAA
15 GTGGCAATAT AAGGGGATGA GGAAGGCATG CCTGGACAAA CCCTTCTTTT
AAGATGTGTC
TTCAATTTGT ATAAAATGGT GTTTTCATGT AAATAAATAC ATTCTTGGAG
GAGC

20 SEQ IDNR. 10 (rekombinant plasmid pDBTrp-MET25-SP-C100-GAL4-VP16)
ACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATA
ATGGTTTCTTAGGACGGATCGCTTGCCTGTAACCTTACACGCGCCTCGTATCT
TTAATGATGGAATAATTTGGGAATTTACTCTGTGTTTATTTATTTTTATGTT
TTGTATTTGGATTTTAGAAAGTAAATAAAGAAGGTAGAAGAGTTACGGAAT
25 GAAGAAAAAAAAATAACAAAGGTTTAAAAAATTTCAACAAAAAGCGTAC
TTTACATATATATTTATTAGACAAGAAAAGCAGATTAATAGATATACATTC
GATTAACGATAAGTAAAATGTAATAACACAGGATTTTCGTGTGTGGTCTTCT
ACACAGACAAGATGAAACAATTCGGCATTAAATACCTGAGAGCAGGAAGAG
CAAGATAAAAGGTAGTATTTGTTGGCGATCCCCCTAGAGTCTTTTACATCTT
30 CGGAAAACAAAACTATTTTTCTTTAATTTCTTTTTTTACTTTCTATTTTTAA
TTTATATATTTATATTAATAAATTTAAATTATAATTATTTTTATAGCACGTGA
TGAAAAGGACCCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTAT
TTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA
CCCTGATAAATGCTTCAATAATCTGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAAATCTC
35 TGATGTTACATTGCACAAGATAAAAATATATCATCATGAACAATAAACTG
TCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGG
GAAACGTCTTGCTGGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTAT

ATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCT
 TTCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCA
 AAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGC
 TGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGA
 5 TGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCGCGGGAAAACAGCATTCCAGGT
 ATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGT
 GTTCCTGCGCCGGTTGCATTCGATTCCTGTTTGTAAATTGTCCTTTTAACAGCG
 ATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGT
 TGATGCGAGTGATTTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGT
 10 CTGGAAAGAAATGCATACGCTTTTGCCATTCTCACCGGATTCAGTCGTCACT
 CATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAG
 GTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTG
 CCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCT
 TTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAAATTGCAGTTTCAT
 15 TTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACACT
 GGCAGAGCATTACGCTGACTTGACGGGACGGCGCATGACCAAATCCCTTA
 ACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG
 ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAA
 AACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCT
 20 TTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTT
 CTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTA
 CATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAA
 GTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCA
 GCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAAC
 25 GACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCAC
 GCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCG
 GAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGGAACGCCTGGTATCTTT
 ATAGTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATG
 CTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTT
 30 ACGGTTCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTAT
 CCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGC
 TCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGG
 AAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATT
 AATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCA
 35 ACGCAATTAATGTGAGTTACCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTT
 TATGCTTCCGGCTCCTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTAC
 ACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCGGAATTAACCCTCAC

TAAAGGGAACAAAAGCTGGTACCGATCCCGAGCTTTGCAAATTAAGCCTT
 CGAGCGTCCCAAAACCTTCTCAAGCAAGGTTTTTCAGTATAATGTTACATGCG
 TACACGCGTCTGTACAGAAAAAAGAAAAATTTGAAATATAAATAACGTT
 CTTAATACTAACATAACTATAAAAAAATAAATAGGGACCTAGACTTCAGGT
 5 TGTCTAACTCCTTCCTTTTCGGTTAGAGCGGATGTGGGGGGAGGGCGTGAAT
 GTAAGCGTGACATAACTAATTACATGATATCGACAAAGGAAAAGGGGCCTG
 TTTACTCACAGGCTTTTTTCAAGTAGGTAATTAAGTCGTTTCTGTCTTTTTCC
 TTCTTCAACCCACCAAAGGCCATCTTGGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
 TT
 10 TTTTTTTTTTTTTTTCATAGAAATAATACAGAAGTAGATGTTGAATTAGATTAA
 ACTGAAGATATATAATTTATTGGAAAATACATAGAGCTTTTTGTTGATGCGC
 TTAAGCGATCAATTCAACAACACCACCAGCAGCTCTGATTTTTTCTTCAGCC
 AACTTGGAGACGAATCTAGCTTTGACGATAACTGGAACATTTGGAATTCTAC
 CCTTACCCAAGATCTTACCGTAACCGGCTGCCAAAGTGTCAATAACTGGAG
 15 CAGTTTCCTTAGAAGCAGATTTCAAGTATTGGTCTCTCTTGTCTTCTGGGATC
 AATGTCCACAATTTGTCCAAGTTCAAGACTGGCTTCCAGAAATGAGCTTGTT
 GCTTGTGGAAGTATCTCATAACCAACCTTACCGAAATAACCTGGATGGTATTT
 ATCCATGTTAATTCTGTGGTGATGTTGACCACCGGCCATACCTCTACCACCG
 GGGTGCTTTCTGTGCTTACCGATACGACCTTTACCGGCTGAGACGTGACCTC
 20 TGTGCTTTCTAGTCTTAGTGAATCTGGAAGGCATTCTTGATTAGTTGGATGA
 TTGTTCTGGGATTTAATGCAAAAATCACTTAAGAAGGAAAATCAACGGAGA
 AAGCAAACGCCATCTTAAATATACGGGATACAGATGAAAGGGTTTGAACCT
 ATCTGGAAAATAGCATTAAACAAGCGAAAAACTGCGAGGAAAATTGTTTGC
 GTCTCTGCGGGCTATTCACGCGCCAGAGGAAAATAGGAAAAATAACAGGGC
 25 ATTAGAAAAATAATTTTGATTTTGGTAATGTGTGGGTCTGGTGTACAGATG
 TTACATTGGTTACAGTACTCTTGTTTTGCTGTGTTTTTCGATGAATCTCCAA
 AATGGTTGTTAGCACATGGAAGAGTCACCGATGCTAAGTTATCTCTATGTAA
 GCTACGTGGCGTGACTTTTGATGAAGCCGCACAAGAGATACAGGATTGGCA
 ACTGCAAATAGAATCTGGGGATCCCCCTCGACGGATGCAAGGGTTCTGAAT
 30 CCCTTAGCTCTCATTATTTTTTGCTTTTTTCTCTTGAG.GTSGTCACATGATCGC
 AAAATGGCAAATGGCACGTGAAGCTGTCGATATTGGGGAACTGTGGTGGTT
 GGCAAATGACTAATTAAGTTAGTCAAGGCGCCATCCTCATGAAAACCTGTGT
 AACATAATAACCGAAGTGTGCGAAAAGGTGGCACCTTGTCCAATTGAACACG
 CTCGATGAAAAAATAAGATATATATAAGGTTAAGTAAAGCGTCTGTTAGA
 35 AAGGAAGTTTTTCCTTTTTCTTGCTCTCTTGTCTTTTCATCTACTATTTCTTC
 GTGTAATACAGGGTCGTCAGATACATAGATACAATTCTATTACCCCATCCA
 TACATCTAGAACTAGTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTT

CACAGCTAGCGCACTCGGTGCCCGCGCAGGGTCGCGATGCTGCCCGGTTT
GGCACTGTTCTGCTGGCCGCTGGACGGCTCGGGCGCTGGATGCAGAATT
CCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAAATTGGTGTCTTTGCA
GAAGATGTGGGTTCAAACAAAGGTGCAATCATTGGACTCATGGTGGGCGGT
5 GTTGTCATAGCGACAGTGATCGTCATCACCTTGGTGATGCTGAAGAAGAAA
CAGTACACATCCATTTCATCATGGTGTGGTGGAGGTTGACGCCGCTGTCACCC
CAGAGGAGCGCCACCTGTCCAAGATGCAGCAGAACGGCTACGAAAATCCA
ACCTACAAGTTCTTTGAGCAGATGCAGAACGCGCGGGGTACCCCGGCGATG
AAGCTACTGTCTTCTATCGAACAAGCATGCGATATTTGCCGACTTAAAAAGC
10 TCAAGTGCTCCAAAGAAAAACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTGAAGAACAAC
GGGAGTGTCGCTACTCTCCAAAACCAAAAGGTCTCCGCTGACTAGGGCAC
ATCTGACAGAAGTGGAATCAAGGCTAGAAAGACTGGAACAGCTATTTCTAC
TGATTTTTCTCGAGAAGACCTTGACATGATTTTGAAAATGGATTCTTTACA
GGATATAAAAGCATTGTTAACAGGATTATTTGTACAAGATAATGTGAATAA
15 AGATGCCGTCACAGATAGATTGGCTTCAGTGGAGACTGATATGCCTCTAAC
ATTGAGACAGCATAGAATAAGTGCGACATCATCATCGGAAGAGAGTAGTAA
CAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTATCGCCGGAATTCCCGGGGATCTGGGC
CCCCCGACCGATGTCAGCCTGGGGGACGAGCTCCACTTAGACGGCGAGGA
CGTGGCGATGGCGCATGCCGACGCGCTAGACGATTTTCGATCTGGACATGTT
20 GGGGGACGGGGATTCCCCGGGGCCGGGATTTACCCCCACGACTCCGCCCC
CTACGGCGCTCTGGATATGGCCGACTTCGAGTTTGAGCAGATGTTTACCGAT
GCCCTTGGAATTGACGAGTACGGTGGGTAGGGATCCACTAGTCCAGTGTGG
TGGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGACCCCGGGTGCT
AGCAAGGCCTTGTGGCCAGCCATGGCAACTAGTGCGGCCGCTAAGTAAGTA
25 AGACGTCGAGCTCTAAGTAAGTAACGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTTTGGA
CTTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTCGGCTTGTCT
ACCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAGA
TACGTTGTTGACACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTTAT
TATTAATAAGTTATAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTGACTCT
30 TAGGTTTTAAACGAAAATTTCTTGTCTTGAGTAACTCTTTCCTGTAGGTCA
GGTTGCTTTCTCAGGTATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTAC
CGGCATGCCGAGCAAATGCCTGCAAATCGCTCCCATTTACCCAATTGTAG
ATATGCTAACTCCAGCAATGAGTTGATGAATCTCGGTGTGTATTTTATGTCC
TCAGAGGACAATACTGTTGTAATCGTTCTTCCACACGGATCCCAATTCGCC
35 CTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGAC
TGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTT
TCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC

AGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAG
 CGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGC
 CCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTTCTCGCCACGTTGCGCG
 GCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAG
 5 TGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGT
 AGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCA
 CGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTAT
 CTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGT
 TAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATAT
 10 TAACGTTTACAATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTA
 TTTCACACCGCAGGCAAGTGCACAAACAATACTTAAATAAATACTACTCAG
 TAATAACCTATTTCTTAGCATTTTTGACGAAATTTGCTATTTTGTTAGAGTCT
 TTTACACCATTTGTCTCCACACCTCCGCTTACATCAACACCAATAACGCCAT
 TTAATCTAAGCGCATCACCAACATTTTCTGGCGTCAGTCCACCAGCTAACAT
 15 AAAATGTAAGCTTTCGGGGCTCTCTTGCCTTCCAACCCAGTCAGAAATCGAG
 TTCCAATCCAAAAGTTCACCTGTCCACCTGCTTCTGAATCAAACAAGGGAA
 TAAACGAATGAGGTTTCTGTGAAGCTGCACTGAGTAGTATGTTGCAGTCTTT
 TGGAAATACGAGTCTTTTAATAACTGGCAAACCGAGGAACTCTTGGTATTCT
 TGCCACGACTCATCTCCATGCAGTTGGACGATATCAATGCCGTAATCATTGA
 20 CCAGAGCCAAAACATCCTCCTTAGGTTGATTACGAAACACGCCAACCAAGT
 ATTTTCGGAGTGCCTGAACTATTTTTATATGCTTTTACAAGACTTGAAATTTTC
 CTTGCAATAACCGGGTCAATTGTTCTCTTTCTATTGGGCACACATATAATAC
 CCAGCAAGTCAGCATCGGAATCTAGAGCACATTCTGCGGCCTCTGTGCTCTG
 CAAGCCGCAAACCTTTCACCAATGGACCAGAACTACCTGTGAAATTAATAAC
 25 AGACATACTCCAAGCTGCCTTTGTGTGCTTAATCACGTATACTCACGTGCTC
 AATAGTCACCAATGCCCTCCCTCTTGCCCTCTCCTTTTCTTTTTTCGACCGA
 ATTAATTCTTAATCGGCAAAAAAAGAAAAGCTCCGGATCAAGATTGTACGT
 AAGGTGACAAGCTATTTTTCAATAAAGAATATCTTCCACTACTGCCATCTGG
 CGTCATAACTGCAAAGTACACATATATTACGATGCTGTCTATTAAATGCTTC
 30 CTATATTATATATATAGTAATGTCGTTTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTG
 CTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGA
 CGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTG
 ACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAAC
 GCGCGA

35

SEQ IDNR. 11 (SP-C100-GAL4-VP16 fusjonsprotein)

MLPGLALFLL AAWTARALDA EFRHDSGYEV HHQKLVFFAE DVGSNKGAI

GLMVGGVVIA TVIVITLVML KKKQYTSIHH GVVEVDAAVT PEERHLSKMQ
 QNGYENPTYK FFEQMQRNARG TPAMKLLSSI EQACDICRLK KLKCSKEKPK
 CAKCLKNNWE CRYSPKTKRS PLTRAHLTEV ESRLERLEQL FLLIFPREDL
 DMILKMDSLQ DIKALLTGLF VQDNVNKDAV TDRLASVETD MPLTLRQHRI
 5 SATSSSEESS NKGQRQLTVS PEFPGIWAPP TDVSLGDELH LDGEDVAMAH
 ADALDDFDLD MLGDGDSPGP GFTPHDSAPY GALDMADFEF EQMFTDALGI
 DEY GG

SEQ IDNR. 12 (Signalpeptid til gjær SUC2-gen (SP2))

10 MLLRAFLFLLAGFAAKISAALA

SEQ IDNR. 13 (Signalpeptid til pattedyrbasalt membranprotein BM40 (SP3))

MRAWIFFLLCLAGRALA

15 SEQ IDNR. 14 (SP-C55-GAL4-VP16)

MLPGLALFLL AAWTARALDA EFRHDSGYEV HHQKLVFFAE DVGSNKGAI
 GLMVGGVVIA TVIVITLVML KKKGRSGKLL SSIEQACDIC RLKCLKCSKE
 KPKCAKCLKN NWECRYSPKT KRSPLTRAHL TEVESRLERL EQLFLLIFPR
 EDLMILKMD SLQDIKALLT GLFVQDNVNK DAVTDRLASV ETDMPLTLRQ
 20 HRISATSSSE ESSNKGQRQL TVSPEFPGIW APPTDVSLGD ELHLDGEDVA
 MAHADALDDF DLDMLGDGDS PGPFGTPHDS APYGALDMAD FEFEQMFTDA
 LGIDEYGG

SEQ IDNR. 15 (SP-C55-GAL4/VP16-TAG)

25 1 gacggatcgg gagatctccc gatccccat ggtcgactct cagtacaate tgcctgatg
 61 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgcg gagtagtgcg
 121 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc
 181 ttagggtag gcgtttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt
 241 gattattgac tagtattaa tagtaataca ttacggggtc attagttcat agcccatata
 30 301 tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc
 361 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttccatagat aagccaata gggactttcc
 421 attgacgtca atgggtggac tatttaggt aactgccc cttggcagta catcaagtgt
 481 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt
 541 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagta
 35 601 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg
 661 actcacgggg attccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc
 721 aaaatcaacg ggactttcca aatgtcgtg acaactcgcg cccattgacg caaatgggcg

781 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca
 841 ctgcctaact ggcttatoga aattaatacg actcactata gggagaccca agcttctgcc
 901 tgccgcctgc ctgcctgcca ctgagggttc ccagcaccat gagggcctgg atcttcttc
 961 tccittgctt ggccgggagg gctctggcag ccccgctagc tgatgcagaa ttccgacatg
 5 1021 actcaggata tgaagttcat catcaaaaat tgggtgttct tgcagaagat gtgggttcaa
 1081 acaaagggtc aatcattgga ctcatgggtg gcggtgttgt catagcgaca gtgatcgta
 1141 tcaccttggg gatgctgaag aagaaaggta gatctggcaa gctactgtct tctatcgaac
 1201 aagcatgca tatttgcca cftaaaaagc tcaagtgtc caaagaaaaa ccgaagtgcg
 1261 ccaagtgtct gaagaacaac tgggagtgct gctactctcc caaaacaaa aggtctccg
 10 1321 tgactagggc acatctgaca gaagtggaat caaggctaga aagactggaa cagctatttc
 1381 tactgatttt tectcgagaa gacctgaca tgatttgaa aatggattct ttacaggata
 1441 taaaagcatt gttacagga ttattgtac aagataatgt gaataaagat gccgtcacag
 1501 atagattggc ttcagtgag actgatatgc cttaacatt gagacagcat agaataagtg
 1561 cgacatcacc atcggaagag agtagtaaca aaggtcaaag acagttgact gtatcgccgg
 15 1621 aattcccggg gatctgggcc cccccgaccg atgtcagcct gggggacgag ctccacttag
 1681 acggcgagga cgtggcgatg gcgcatgccg acgcgctaga cgatttcgat ctggacatgt
 1741 tgggggacgg ggattccccg ggtccgggat ttacccccca cgactccgcc cctacggcg
 1801 ctctggatat ggccgacttc gatttgagc agatgtttac cgatgccctt ggaattgacg
 1861 agtacgggtg gggtagaaa atcgataccg tcgaggccgc tcgagcatgc atctagaggg
 20 1921 ccctattcta tagtgcacc taaatgctag agctcgtga tcagcctcga ctgtgccttc
 1981 tagttgccag ccactgttg ttgccccctc ccccgctcct tcttgacct tggaagggtc
 2041 cactcccact gtccttctct aataaaatga ggaaattgca tcgattgtc tgagtaggtg
 2101 tcattctatt ctgggggggtg ggggtgggca ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa
 2161 tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatggaacca gctggggctc gaggggggat
 25 2221 cccacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggtac gcgcagcgtg
 2281 accgctacac ttgccagcgc cctagcgcgc gctccttctg ctttcttccc ttccttctc
 2341 gccacgttcg ccggcttcc ccgtcaagct ctaaatcggg gcatcccttt agggttccga
 2401 tttagtgtt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt aggtgatgg ttcacgtagt
 2461 gggccatgc cctgatagac ggttttgc ctttgactg ttgagtcac gttctttaat
 30 2521 agtggactct tgttcaaac tggaacaaca ctcaacccta tctcggctc ttctttgat
 2581 ttataaggga ttttgggat ttcggcctat tggftaaaaa atgagctgat ttaacaaaa
 2641 tttaacgca atttaaca aatattaacg ttacaattt aatatttgc ttatacaatc
 2701 ttctgtttt tggggctttt ctgattatca accgggggtg gtaccgagct cgaattctgt
 2761 ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaagt ccccaggctc ccaggcagg cagaagtatg
 35 2821 caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg ctccccagca
 2881 ggcagaagta tgcaagcat gcactcaat tagtcagcaa ccatagtcce gcccttaact
 2941 ccgcccaccc cgcccctaac tccgcccagt tccgcccatt ctccgcccga ttgctgacta

3001 attttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt ccagaagtag
 3061 tgaggagget ttttgagg cctaggcttt tgcaaaaagc tcccgggagc ttggatatcc
 3121 atttcggat ctgatcaaga gacaggatga ggatcgtttc gcatgattga acaagatgga
 3181 ttgcacgcag gttctccggc cgcttgggtg gagaggctat tcggctatga ctgggcacaa
 5 3241 cagacaatcg gctgctctga tgccgccgtg ttccggctgt cagcgcaggg gcgcccggtt
 3301 cttttgtca agaccgacct gtccgggtcc ctgaatgaac tgcaggacga ggcagcgcgg
 3361 ctatcgtggc tggccacgac gggcgttcct tgcgcagctg tgctcgactg tgcactgaa
 3421 gcgggaaggg actggctgct attggcgaa gtgccggggc aggatctcct gtcactcacc
 3481 cttgctcctg ccgagaaagt atccatcatg gctgatgcaa tgcggcggct gcatacgtt
 10 3541 gatccggcta cctgcccaat cgaccaccaa gcgaaacatc gcatcgagcg agcacgtact
 3601 cggatggaag ccggtcttgt cgatcaggat gatctggacg aagagcatca ggggctcgcg
 3661 ccagccgaac tgttcgccag gctcaaggcg cgcatgcccg acggcgagga tctcgtcgtg
 3721 acctatggcg atgcctgctt gccgaatc atggtgaaa atggccgctt ttctggattc
 3781 atcactgtg gccggctggg tgtggcggac cgctatcagg acatagcgtt ggctaccgt
 15 3841 gatattgctg aagagcttgg cggcgaatgg gctgaccgt tctcgtgct ttacggatc
 3901 gccgtcccg attcgcagcg catgccttc tctgccttc ttgacgagtt cttctgagcg
 3961 ggactctggg gttcgaatg accgaccaag cgacgcccc cctgcatca cgagatttcg
 4021 atccaccgc cgccttctat gaaaggttgg gcttcggaat cgtttccgg gacgccggct
 4081 ggatgatcct ccagcgcggg gatctcatgc tggagttctt cgccccccc aactgttta
 20 4141 ttgcagctta taatggttac aataaagca atagcatcac aaattcaca aataaagcat
 4201 tttttact gattctagt tgtggttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct
 4261 ggatccgctc gacctcgaga gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa
 4321 ttgtatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg
 4381 gggcgcctaa tgagtgagct aactcacatt aattgcgtg cgctcactgc ccgcttcca
 25 4441 gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagagcgcg
 4501 tttgcgtatt gggcgtctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct cggctgttcg
 4561 gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg
 4621 ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa
 4681 ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg
 30 4741 acgtcaagt cagaggtggc gaaaccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc
 4801 tggaagetcc ctctgctcct ctctgttcc gacctgccg cttaccggat acctgtccg
 4861 ctttccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcaatgctca cgctgtagg atctcagttc
 4921 ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg
 4981 ctgcgctta tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc
 35 5041 actggcagca gccactggtg acaggattag cagagcgagg tatgtaggag gtgctacaga
 5101 gttcttgaag tggcggccta actacggcta cactagaagg acagtattg gtatctgcg
 5161 tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttgtagc tcttgatccg gcaacaaac

5221 caccgctggt agcgggtggt ttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg
 5281 atcacaagaa gatccttga tctttctac ggggtctgac gctcagtga acgaaaact
 5341 acgttaaggg attttggtca tgagattac aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaa
 5401 ttaaaaatga agttttaa caatctaaag tatatatgag taaacttgg ctgacagtta
 5 5461 ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctattctgt catccatagt
 5521 tgcctgactc cccgtctgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag
 5581 tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc accggctcca gatttatcag caataaacca
 5641 gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tctgcaact ttatccgct ccatccagt
 5701 tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagt tgcgcaact
 10 5761 tgttgccatt gctacaggca tegtgtgtc acgctctcg tttggtatgg ctccattcag
 5821 ctccggtcc caacgatca ggcgagtac atgatcccc atgttgcgca aaaaagcgg
 5881 tagctcttc ggtctccga tegtgtcag aagtaagt ggcgagtgt taccatc
 5941 gggtatgca gcaactgata attctctac tgcattgcca tccgtaagat gctttctgt
 6001 gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagt atgcggcgac cgagtgtc
 15 6061 ttgcccggcg tcaatacggg ataatacgc gccacatagc agaacttaa aagtgtcat
 6121 cattgaaaa cgttctcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag
 6181 ttcgatgtaa cccactctg cacccaactg atcttcagca tctttactt tcaccagct
 6241 ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg
 6301 gaaatgtga atactcatac tctctcttt tcaatattat tgaagcatt atcagggtta
 20 6361 ttgtctcatg agcggataca ttttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggtcc
 6421 ggcacattt cccgaaaag tgccacctga cgtc

SEQ IDNR.16 (rekombinant plasmid pDBTrp-MET25-SP-C-Gal4/VP16-100)

1 gacgaaaggg cctctgata cgcctattt tataggtaa tgcattgata ataattggtt
 25 61 cttaggacgg atcgcttgc tgtaacttac acgcgcctc tatctttta tgatggaata
 121 atttgggaat ttactctgt tttattatt tttatgttt gtatttggat tttagaaagt
 181 aaataaagaa ggtagaagag ttacggaatg aagaaaaaa aataaacaaa ggttataaaa
 241 attcaacaa aaagcgtact ttacatata attattaga caagaaaagc agattaata
 301 gatatacatt cgattaacga taagtaaaat gtaaaatcac aggatttctg tgtgtgtct
 30 361 tctacacaga caagatgaaa caattcgca ttaatacctg agagcaggaa gagcaagata
 421 aaaggtagta tttgtggcg atccccctag agtctttac atcttcggaa acaaaaact
 481 atttttctt taattctt tttacttc ttttttaatt ttatataatt atattaaaa
 541 atttaaita taattattt tatagcacgt gatgaaaagg acccaggtgg cactttcgg
 601 ggaaatgtc gcggaacccc tattgttta ttttctaaa tacattcaa tatgtatccg
 35 661 ccatgagac aataacctg ataatgctt caataatctg cagctctggc ccgtgtctca
 721 aaatctctga ttttacattg cacaagataa aaatataca tcatgaacaa taaaactgtc
 781 tgcttata aacagtaata caaggggtgt tatgagccat attcaacggg aaactctt

841 ctggaggccg cgattaaatt ccaacatgga tgctgatta tatgggtata aatgggctcg
 901 cgataatgtc gggcaatcag gtgcgacaat ctttcgattg tatgggaagc ccgatgcgcc
 961 agagttgttt ctgaaacatg gcaaaggtag cgttgccaat gatgttacag atgagatggt
 1021 cagactaaac tggctgacgg aatttatgcc tcttcgacc atcaagcatt ttatccgtac
 5 1081 tctgatgat gcatggttac tcaccactgc gatccgcggg aaaacagcat tccaggtatt
 1141 agaagaatat cctgattcag gtgaaaatat tgttgatgcg ctggcagtgt tctgcgccg
 1201 gttgcattcg attcctgttt gtaattgtcc tttaacagc gatcgcgtat ttcgtctcg
 1261 tcaggcgaac tcacgaatga ataacggttt ggttgatgcg agtgattttg atgacgagcg
 1321 taatggctgg cctgttgaac aagtctggaag agaaatgcat acgcttttgc cattctcacc
 10 1381 ggattcagtc gtcactcatg gtgatttctc acttgataac cttattttg acgaggggaa
 1441 attaataggt tgtattgatg ttggacgagt cggaatcgca gaccgatacc aggatcttgc
 1501 catcctatgg aactgcctcg gtgagtttct tcttcatta cagaaacggc ttttcaaaa
 1561 atatggtatt gataatcctg atatgaataa attgcagttt catttgatgc tcgatgagtt
 1621 ttttaataca gaattggta attggttga aactggcag agcattacgc tgacttgacg
 15 1681 ggacggcgca tgaccaaaat ccctaacgt gagtttctg tccactgagc gtcagacccc
 1741 gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg
 1801 caaacaanaa aaccaccgct accagcgggtg gtttgttgc cggatcaaga gctaccaact
 1861 cttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt cttctagtg
 1921 tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg
 20 1981 ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac
 2041 tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca
 2101 cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga
 2161 gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccgtaag cggcagggtc
 2221 ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca ggggggaacg cctggtatct ttatagtct
 25 2281 gtcgggttct gccacctctg acttgagcgt cgattttgt gatgctctgc agggggggccg
 2341 agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc ttttacggt tcttgccctt ttgctggcct
 2401 tttgctcaca tgttcttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc
 2461 tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc
 2521 gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa ccgctctccc ccgcgcgttg gccgattcat
 30 2581 taatgcagct ggcacgacag gtttccgac tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt
 2641 aatgtgagtt acctactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggtctct
 2701 atgttgtgtg gaattgtgag cggataacaa ttccacacag gaaacagcta tgaccatgat
 2761 tacgccaagc tcggaattaa cctcactaa agggaacaaa agctggtacc gatcccagc
 2821 tttgcaaat aaagccttcg agcgtcccaa aacctctca agcaaggttt tcagtataat
 35 2881 gttacatgcg tacacgcgtc tctacagaaa aaaaagaaaa atttgaata taaataacgt
 2941 tcttaatact aacataacta taaaaaata aatagggacc tagacttcag gttgtctaac
 3001 tcttctctt tcggttagag cggatgtggg gggagggcgt gaatgtaagc gtgacataac

3061 taattacatg atacgacaa aggaaaaggg gcctgtttac tcacaggctt tttcaagta
 3121 ggtaattaag tcgtttctgt ctttttcctt cttcaaccca ccaaaggcca tcttggtact
 3181 tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt
 3241 tttttttt tttttttt tttttttt tttcatagaa ataatacaga agtagatggt
 5 3301 gaattagatt aaactgaaga tatataattt attggaaaat acatagagct tttgttgat
 3361 gcgcttaagc gatcaattca acaacaccac cagcagctct gattttttct tcagccaact
 3421 tggagacgaa tctagctttg acgataactg gaacatttgg aattctacce ttaccaaga
 3481 tcttaccgta accggctgcc aaagtgtcaa taactggagc agtttcctta gaagcagatt
 3541 tcaagtattg gtctctcttg tcttctggga tcaatgtcca caattgtcc aagtcaaga
 10 3601 ctggcttcca gaaatgagct tgttgcttgt ggaagtatct cataccaacc ttaccgaaat
 3661 aacctggatg gtatttatcc atgttaattc tgtggtagt tggaccaccg gccatactc
 3721 taccaccggg gtgctttctg tgcttaccga tacgacctt accggctgag acgtgacctc
 3781 tgtgctttct agtcttagtg aatctggaag gcattcttga ttagttggat gattgttctg
 3841 ggatttaatg caaaaatcac ttaagaagga aatcaacgg agaaagcaaa cgccatctta
 15 3901 aatatacggg atacagatga aagggtttga acctatctgg aaaatagcat taaacaagcg
 3961 aaaaactgcg aggaaaattg tttgcgtctc tgcgggctat tcacgcgcca gaggaaaata
 4021 ggaaaaataa cagggcatta gaaaaataat tttgattttg gtaatgtgtg ggtcctggtg
 4081 tacagatgtt acattgggta cagtactctt gtttttctg tgttttctga tgaatctcca
 4141 aaatggttgt tagcacatgg aagagtcacc gatgctaagt tatctctatg taagctacgt
 20 4201 ggcgtgactt ttgatgaagc cgcacaagag atacaggatt ggcaactgca aatagaatct
 4261 ggggatcccc cctcgacgga tgcaagggtt cgaatccctt agctctcatt atttttgct
 4321 ttttctcttg aggtcacatg atcgcaaaat ggcaaatggc acgtgaagct gtcgatattg
 4381 gggaaactgtg gtggttggca aatgactaat taagttagtc aaggcgccat cctcatgaaa
 4441 actgtgtaac ataataaccg aagtgtcga aaggtggcac cttgtccaat tgaacacgt
 25 4501 cgatgaaaaa aataagatat atataagggt aagtaaagcg tctgttagaa aggaagttt
 4561 tctttttct tgctctcttg tcttttcac tactatttcc ttcgtgtaat acagggtcgt
 4621 cagatacata gatacaatc tattaccccc atccatactc tagaatgctt ttgcgagctt
 4681 tcttttctct cttggetggt tttgcagcca aaatatctgc agcgctagct gatgcagaat
 4741 tccgacatga ctcaggatat gaagttcacc atcaaaaatt ggtgttcttt gcagaagatg
 30 4801 tgggttcaaa caaaggtgca atcattggac tcatggtggg cggtgtgtc atagcgacag
 4861 tgatgctcat cacctgggtg atgtgaaga agaaaggtag atctggcaag ctactgtctt
 4921 ctatgaaca agcatcgat atttccgac ttaaaaagct caagtgtccc aaagaaaaac
 4981 cgaagtgcgc caagtgtctg aagaacaact gggagtgtcg ctactctccc aaaacaaaa
 5041 ggtctccgct gactagggca catctgacag aagtggaatc aaggctagaa agactggaac
 35 5101 agctatttct actgattttt cctcgagaag acctgacat gattttgaaa atggattctt
 5161 tacaggatat aaaagcattg ttaacaggat tatttgtaca agataatgtg aataaagatg
 5221 ccgtcacaga tagattggct tcagtggaga ctgatatgcc ttaacattg agacagcata

5281 gaataagtgc gacatcatca tcggaagaga gtagtaacaa aggtcaaaga cagttgactg
 5341 tatcgccgga attcccgggg atctggggcc ccccgaccga tgcagcctg ggggacgagc
 5401 tccacttaga cggcgaggac gtggcgatgg cgcagccga cgcgctagac gatttcgatc
 5461 tggacatgtt gggggacggg gattccccgg gtccgggatt tacccccac gactccgccc
 5 5521 cctacggcgc tctggatatg gccgacttcg agtttgagca gatgtttacc gatgccctg
 5581 gaattgacga gtacggtggg ggtactagt ggcagtacac atccattcat catggtgtgg
 5641 tggaggttga cgccgctgtc accccagagg agcggccacct gtccaagatg cagcagaacg
 5701 gctacgaaaa tccaacctac aagtctttg agcagatgca gaacggcgcc tagggatccc
 5761 ccgggctgca ggaattcgat atcaagctta tcgataaccg cgaccccggg tgctagcaag
 10 5821 gccttgtggc cagccatggc aactagtgcg gccgctaagt aagtaagacg tcgagctcta
 5881 agtaagtaac ggccgccacc gcggtggagc tttggacttc ttcgccagag gtttggtcaa
 5941 gtctccaatc aaggttgcg gcttgtctac ctgcccagaa atttacgaaa agatggaaaa
 6001 gggtaaaatc gttgtagat acgttgttga cacttctaaa taagcgaatt tcttatgatt
 6061 tatgattttt attattaaat aagtataaa aaaaataagt gtatacaaat tttaaagtga
 15 6121 ctcttaggtt taaaacgaa aattcttgtt cttagtaac tcttctctgt aggtcaggtt
 6181 gctttctcag gtatagcatg aggtcgtctt tattgaccac acctctaccg gcatgccgag
 6241 caaatgcctg caaatcgctc cccatttcac ccaattgtag atagctaac tccagcaatg
 6301 agttgatgaa tctcgggtgt tattttatgt cctcagagga caatacctgt tgtaatcgtt
 6361 ctccacacg gatcccaatt cgcctatag tgagtcgtat tacaattcac tggccgctgt
 20 6421 tttacaactg cgtgactggg aaaacctgg cgttaccbaa cttaatcgc ttcagcaca
 6481 tcccccttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccg accgatcgc ctcccaaca
 6541 gttgcgcagc ctgaatggcg aatggacgcg cctgtagcg gcgcatatg cgcggggggt
 6601 gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgctaca ctgcccagcg ccttagcgc cgctccttc
 6661 gctttcttc ctctcttct cgcacgttc gccggcttc cccgtcaagc tctaaatcgg
 25 6721 gggctccctt tagggtccg atttagtct ttacggcacc tcgacccaa aaaacttgat
 6781 tagggtgatg gttcacgtag tgggcatcg cctgataga cggttttcgc cctttgacg
 6841 ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgtccaaa ctggaacaac actcaacct
 6901 atctcggctc attctttga tttataaggg atttgccga ttcggccta ttggttaaaa
 6961 aatgagctga ttaacaaaa attaacgcg aatttaaca aatattaac gtttacaatt
 30 7021 tctgatcgc gtattttct cttacgcatc tgtcgggtat ttcacaccg aggcaagtgc
 7081 acaacaata cttaaataa tactactcag taataacct tttcttagca ttttgacga
 7141 aatttgetat tttgttag tcttttac cattgtctc cacacctcg ctacatcaa
 7201 caccaataac gccattaat ctaagcgcac caccaacatt tctggcgtc agtccaccg
 7261 ctaacataaa atgtaagctt tcgggctct ctgcccctc aaccagtc gaaatcgagt
 35 7321 tccaatcaa aagttacct gtcccacct ctctgaatc aaacaaggga ataacgaat
 7381 gaggtttctg tgaagctgca ctgagtagta tgttcagtc ttttgaaat acgagcttt
 7441 taataactg caaacggagg aactcttgg atcttgcga cgactcatc ccatgcagt

7501 ggacgatatac aatgccgtaa tcattgacca gagccaaaac atcctcctta ggttgattac
 7561 gaaacacgcc aaccaagtat ttgggagtgct gaactatt tttatatgct ttacaagac
 7621 ttgaaatctt ccttgcaata accgggtcaa ttgttctctt tctattgggc acacataaa
 7681 taccagcaa gtcagcatcg gaatctagag cacattctgc ggcctctgtg ctctgcaagc
 5 7741 cgcaaacttt caccaatgga ccagaactac ctgtgaaatt aataacagac atactccaag
 7801 ctgcctttgt gtgcttaatac acgtatactc acgtgctcaa tagtcaccaa tgcctcctc
 7861 cttggccctc tcctttctt ttttcgaccg aattaattct taatcgcaa aaaaagaaaa
 7921 gctccggatc aagattgtac gtaagtgac aagctatctt tcaataaaga atatctcca
 7981 ctactgcat ctggcgtcat aactgcaaag tacacatata ttacgatgct gtctattaa
 10 8041 tgcttctat attatatata tagtaatgct gttatggg cactctcagt acaatctgct
 8101 ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac
 8161 gggctgtct gctcccgca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca
 8221 tgtgctagag gtttcaccg tcatcaccg aacgcgcga

15 SEQ IDNR.17 (SP2-C-GAL4/VP16-100)

atgcttttgcgagctttcctttctcttggctggtttgcagccaaaatatctgcagcgttagctgatgcagaattccgacatgact
 caggatatgaagttcatcatcaaaaattggtgttctttgcagaagatgtgggtcaacaaagggtgcaatcattggactcatggtg
 ggcgggtgtgcatagcgacagtgtatcgtcatcacctgggtgatgctgaagaagaaaggtagatctggcaagctactgtcttcta
 tgaacaagcatgcgataattgccgacttaaaaagctcaagtgtcctcaagaaaaaccgaagtgcgccaagtgtctgaagaac
 20 aactgggagtgctgctactctcccaaaacaaaaggctcctccgctgactaggccacatctgacagaagtggaaatcaaggctag
 aaagactggaacagctatttctactgattttctcgcgagaagaccttgacatgatttgaaaatggattctttacaggatataaaagc
 attgttaacaggattattgtacaagataatgtgaataaagatgccgtcacagatagattggcttcagtgaggactgatatgcctct
 aacattgagacagcatagaataagtgcgacatcatcatcggaaagagagtagtaacaaagggtcaaagacagttgactgtatcgc
 cggaattccgggggatctgggccccccgaccgatgtcagcctgggggacgagctccacttagacggcgaggacgtggcg
 25 atggcgcatgccgacgcgctagacgatttcgatctggacatgttgggggacggggattccccggggccgggatttaccctcc
 acgactccgcccctacggcgctctggatagccgacttcgagttgagcagatgtttaccgatcccttggaaattgacgagt
 acggtgggggtactagtggccagttacatccattcatcatggtgtggtggaggtgacgccgctgtcaccagaggagcg
 ccacctgtccaagatgcagcagaacggctacgaaaatccaacctacaagttctttgagcagatgcagaacggcgccctag

30 SEQ IDNR.18 (SP2-C-GAL4/VP16-100)

mllraflflagfaakisaaladaefrhdsgeyevhhqklvffaedvgsnkgaiiglmvggvviatvivitlvmlkkgrsgkl
 lssieqacdicrllkklcskekpkcakclknwecryspktrsptrahltevesrlerleqlflifpredldmilkmdslqd
 ikalltglfvqdnvkdavtdrlasvetdmpitlrqhrisatssseessnkgqrqltvspefpgiwapptdvsldelhdge
 dvamahadalddfdldmldgdspgpgftphdsapygaldmadfefeqmftdalgideygggtsgqytsihhgvvvev
 35 daavtpeerhlskmqngyenptykffeqmngga*

SEQ IDNR.19 (SP2-C100-GAL4/VP16)

atgcttttgcgagctttcctttcctcttggtggtttgcagccaaaatatctgcagcgctagctgatgcagaattccgacatgact
 caggatatgaagttcatcatcaaaaattggtgttctttgcagaagatgtgggtcaacaaagggtgcaatcattggactcatggtg
 ggcgggtgtgtcatagcgacagtgatcgtcatcaccttggtgatgctgaagaagaacagtacacatccattcatcatggtgtg
 5 tggagggtgacgccgctgcacccagaggagcgccacctgtccaagatgcagcagaacggctacgaaaatccaacctaca
 agttctttgagcagatgcagaacgcgcgggtacccggcgatgaagctactgtcttctatcgaacaagcatgcgatatttggc
 gacttaaaaagctcaagtgtcctcaagaaaaaccgaagtgcgccaagtgtctgaagaacaactgggagtgtcgctactctcc
 aaaacaaaaggctcctcgctgactagggcacatctgacagaagtggaatcaaggctagaagactggaacagctatttctact
 gattttctcgcagaagacctgacatgattttgaaaatggattctttacaggatataaaagcattgttaacaggattattgtacaag
 10 ataatgtgaataaagatgccgtcacagatagattggcttcagtggagactgatatgccttaacattgagacagcatagaataag
 tgcgacatcatcatcggaagagagtagtaacaaagggtcaagacagttgactgtatcgccggaattcccgggatctgggcc
 cccccgaccgatgtcagcctgggggacgagctccacttagacggcgaggacgtggcgatggcgcatgccgacgcgctag
 acgatttcgatctggacatgttgggggacggggattccccgggtccgggatttccccccacgactccgccccctacggcgct
 ctggatatggccgacttcgagtttgagcagatgtttaccgatgcccttgaattgacgagtacgggtgggtag

15

SEQ IDNR.20 (SP2-C100-GAL4/VP16)

mllraflflagfaakisaaladaefrhdsgeyevhhqklvffaedvgsnkgaiiglmvggvviatvivitlvmlkkkqytsih
 hgvvevdaavtpeerhlskmqqngyenptykffeqmqnargtpamkillssieqacdicrlkklkcskepkcakclkn
 nwecryspktrspltrahltevesrlerleqlflifpredldmilkmdslqdikalltglfvqdnvknkdvtdrlasvetdm
 20 pltlrhrhisatssseessnkgqrqltvspefpgiwapptdvsldelhdgedvamahadalddfdldmldgdgdsppgpf
 tphdsapygaldmadfefeqmftdalguideygg

SEQ IDNR.21 (SP3-C100-GAL4/VP16)

atgagggcctggatcttcttctcttcttcttgcctggccgggagggtcttggcagccccgctagctgatgcagaattccgacatgac
 25 tcaggatatgaagttcatcatcaaaaattggtgttctttgcagaagatgtgggtcaacaaagggtgcaatcattggactcatggt
 gggcgggtgtgtcatagcgacagtgatcgtcatcaccttggtgatgctgaagaagaacagtacacatccattcatcatggtgtg
 gtggagggtgacgccgctgtcacccagaggagcgccacctgtccaagatgcagcagaacggctacgaaaatccaacctac
 aagttctttgagcagatgcagaacgcgcgggtacccggcgatgaagctactgtcttctatcgaacaagcatgcgatatttgc
 cgacttaaaaagctcaagtgtcctcaagaaaaaccgaagtgcgccaagtgtctgaagaacaactgggagtgtcgctactctcc
 30 caaaacaaaaggctcctcgctgactagggcacatctgacagaagtggaatcaaggctagaagactggaacagctatttctac
 tgattttctcgcagaagacctgacatgattttgaaaatggattctttacaggatataaaagcattgttaacaggattattgtacaa
 gataatgtgaataaagatgccgtcacagatagattggcttcagtggagactgatatgccttaacattgagacagcatagaataa
 gtgcgacatcatcatcggaagagagtagtaacaaagggtcaagacagttgactgtatcgccggaattcccgggatctgggc
 cccccgaccgatgtcagcctgggggacgagctccacttagacggcgaggacgtggcgatggcgcatgccgacgcgcta
 35 gacgatttcgatctggacatgttgggggacggggattccccgggtccgggatttccccccacgactccgccccctacggcg
 ctctggatatggccgacttcgagtttgagcagatgtttaccgatgcccttgaattgacgagtacgggtggg

SEQ IDNR.22 (SP3-C100-GAL4/VP16)

mrawifllclagralaapladaefrhdsgeyvhqklvffaedvgsnkgaiiglmvggvviatevivitlvmlkkkqytsih
 hgvvevdaavtpeerhlskmqqngyenptykffeqmqnargtpamkllssieqacdicrlkklkcskepkcakclkn
 nwecryspktrkspltrahltevesrlerleqlfillifpredldmilkmdslqdikalltglfvqdnvkdavtdrlasvetdm
 5 pltlrghrisatssseessnkgqrqltvspefpgiwapptdvslgdelhldgedvamahadalddfdldmlgdgdspgpgf
 tphdsapygaldmadfefeqmftdalguideygg

SEQ IDNR.23 (Primer EH47)

GCTCTAGAATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCCTTTTGGCTGGTTTTGC AGCC
 10 AAAATATCTGCAGCGCTAGCTGATGCAGAATTCCGACATGAC

SEQ IDNR.24 (Primer EH49)

CGGGATCCCTAGGCGCCGTTCTGCATCTGCTCAAAGAAC

15 SEQ IDNR.25 (Primer EH53)

ACTATATCTAGAATGCTTTTGC

SEQ IDNR.26 (Primer EH54)

TTCGATAGAAGACAGTAGCTTGCCAGATCTACCTTTCTTCTTCAGCATC
 20 ACCAA

SEQ IDNR.27 (Primer EH55)

TTGGTGATGCTGAAGAAGAAAGGTAGATCTGGCAAGCTACTGTCTTCT
 ATCGAA

25

SEQ IDNR.28 (Primer EH56)

ATGATGAATGGATGTGTACTGGCCACTAGTACCCCCACCGTACTCGTC
 AATT

30 SEQ IDNR.29 (Primer EH57)

AATTGACGAGTACGGTGGGGTACTAGTGGCCAGTACACATCCATTC
 ATCAT

SEQ IDNR.30 (Primer EH59)

35 CGATAAGCTTGATATCGAATTC

SEQ IDNR.31 (Primer C55-3')

CCATCGATTTTCTAACCCCCACCGTA

SEQ IDNR.32 (Plasmid SP3-C-GAL4/VP16-100)

gacggatcgggagatctcccgatcccctatggctgactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatctgct
 5 cccctgcttgtgttggaggctgctgagtagtgcgcgagcaaaathtaagctacaacaaggcaaggcttgaccgacaattgcat
 gaagaatctgcttagggftaggcggtttgctgcttgcgatgtacggccagatatacgcgttgacattgattgactagtta
 ttaatagtaatacaattacggggtcattagttcatagcccataatggagttccgcgttacataaacttacggtaaatggcccgcctgg
 ctgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttccatagtaacgccaatagggactttccattgacg
 tcaatgggtgactatttacggtaaacgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtca
 10 atgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtacatgaccttattgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtc
 atcgtctattaccatggtgatcgggtttggcagtacatcaatggcggtggatagcgggttgactcacggggattccaagtctcca
 cccattgacgtcaatgggagtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaacaactccgccccattgacg
 caaatggcggttaggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaaactagagaaccactgcttaactggc
 ttatcgaataatacagactcactatagggagacccaagcttctgctgcccgcctgctgctgcccactgaggggttcccagcac
 15 catgagggcctggatcttcttctccttggcggggagggctctggcagccccgctagctgatgcagaattccgacatga
 ctcaggatagaagttcatcatcaaaaattggtgttcttgcagaagatgtgggtcaacaagaagggtgcaatcattggactcatgg
 tggcggtgtgtcatagcgacagtgatcgtcatcacttgggtgatgtgaagaagaaggtagatctggcaagctactgtcttc
 tatcgaacaagcatcgatatttccgacttaaaaagctcaagtgctccaaagaaaaaccgaagtgcgccaagtgtctgaaga
 acaactgggagtgctactctcccaaaaacaaaaggctctccgctgactagggcacatctgacagaagtggaatcaaggct
 20 agaaagactggaacagctatttctactgattttctcctcgagaagaccttgacatgattttgaaaatggattctttacaggatataaaa
 gcattgtaacaggattatttgtacaagataatgtgaataaagatgccgtcacagatagattggcttcagtgaggactgatatgcc
 tctaacttgagacagcatagaataagtgcgacatcatcatcggaaagagtagtaacaaagggtcaaagacagttgactgtatc
 gccggaattcccggggatctgggccccccgaccgatgtcagcctgggggacgagctccacttagacggcgaggacgtgg
 cgatggcgcatgccgacgcgctagacgattcgtatctggacatgttgggggacggggattccccggggccgggatttacc
 25 ccacgactccgccccctacggcgctctggatagggcacttcgagttgagcagatgttaccgatgcccttggaaattgacga
 gtacggtgggggtactagtgccagtacacatccattcatcatggtgtggtggaggtgacgccgctgtcaccacagaggag
 cgccacctgtccaagatgcagcagaacggctacgaaaatccaacctacaagttctttgagcagatgcagaacggcgcctagg
 gatccccgggctgcaggaattcgatatcaagcttatcgataccgtcgaggccgctcgagcatgcatctagaggccctattct
 atagtgtcacctaaatgctagagctcgtgatcagcctcgactgtgcttctagttgccagccatctgttgtttgccccctccccgt
 30 gccttcttgaccctggaaggtgccactcccactgtcttcttaataaaatgaggaaattgcatcgattgtctgagtaggtgtc
 attctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcg
 gtgggctctatggaaccagctggggctcgaggggggatccccacgcgccctgtagcggcgcatlaagcgcggcgggtgtg
 gtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgcagcgccttagcgcctccttctgcttcttcccttcttctcgcacggt
 cgccggttccccgtcaagctctaaatcggggatccctttagggttccgatttagtctttacggcacctcgacccccaaaaa
 35 ctgattagggtgatggttacgtagtggccatcgcctgatagacggttttccgctttgacgttggagtcacggttcttaata
 gtggactctgttcaaacggaacaacactcaacctatctcggctctattctttgattataagggttttggggattcggcctat
 tgggtaaaaaatgagctgatttaacaaaaatcaacgcgaatttaacaaaaatattaacggttacaatttaaatattgcttatacaatct

tcctgttttggggctttctgattatcaaccggggtgggtaccgagctcgaattctgtggaatgtgtgacgttaggggtgaggaa
 gtccccaggctccccaggcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccagggtgtgaaagtccccag
 gctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccatagtcgcccccctaactccgcccatcccc
 cccctaactccgccaggtccgccattctccgcccatggctgactaattttttatfatgagaggccgaggccgctcggc
 5 ctctgagctattccagaagttagtgaggaggctttttggaggccttaggcttttgcaaaaagctcccgggagcttgatattccattt
 tcggatctgatcaagagacaggatgaggatctttcgcattgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccttgg
 gtggagaggctattcgctatgactgggcacaacagacaatcggtgctctgatgccgccgtgtccggctgacgcagcagg
 ggcgccgggtcttttgcagaccgacctgcccgtgcccgaatgaactgcaggacgaggcagcggctatcgtggctg
 gccacgacgggcttcttgcagctgtgctcagcttgcactgaagcgggaaggactggctgctattgggcgaagtgc
 10 cggggcaggatctctgcatctcacctgtcctgccgagaaagtatccatcatggctgatcaatgcggcggctgcatacgc
 ttgatccggctacctgccattcgaccaccaagcgaacatcgcacgagcagcactcggatggaagccggtcttctg
 gatcaggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgatccccga
 cggcagaggatctctgctgacccatggcgatgcttgcgaatcatgggtgaaaatggccgctttctggattcatcga
 ctgtggccggctgggtgtggcggaccgctatcaggacatagcgttgctaccctgatattgctgaagagcttggcggcgaat
 15 gggctgaccgcttctctgctttacggtatcggcctcccgattcgcagcgcacatgccttctatgccttctgacgagttctt
 gagcgggactctggggttcgaaatgaccgaccaagcagcgcaccaacctgccatcacgagatttcgattccaccgccccttc
 tatgaaagggtggcttcggaatcgtttccgggacgccggctggatgatctccagcgcgggatctcatgctggattcttc
 gccaccccaactgtttatgacgttataatggttacaataaagcaatagcatcacaatttcacaataaagcatttttact
 gcattctagtgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatcccgtcgacctcgagagcttggcgaatcatggt
 20 catagctgttctgtgtgaaattgtatccgctcacaattccacacaacatacagaccggaagcataaagtgtaaagcctgggg
 tgcctaagttagtaactcacattaattgcttgcctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcatt
 aatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattggcgccttccgcttctcgtcactgactcgtcgtcgc
 gcttccggctcggcagcggatcagctcactcaaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaa
 agaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgcgtgcttccataggtccgcc
 25 cccctgacgagcatcaaaaatcagcgtcaagtcagagggtggcgaacccgacaggactataaagataaccaggcgtttc
 cccctggaagctccctcgtcgtcctcgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgcttctccttccgggaagcgt
 ggcgctttctcaatgctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttgcctcaagctgggctgtgtgcacgaaccccc
 gttcagcccgaccgctcgccttatccggttaactatgctttagtccaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagca
 gccactggtaacaggattagcagagcaggtatgtaggcgggtctacagagttcttgaagtggcctaactacggctacac
 30 tagaaggacagatattggtatctcgcctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagcttctgatccggcaaa
 accaccgctgtagcgggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatcacaagaagatcctttgatctt
 ttctacggggtcagcgtcagtggaacgaaaactcagtttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcactag
 atccttttaataaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatagtaaacttggctgacagttaccaatgcttaatacagta
 ggcacctatctcagcagctgtctatttcgttcatccatagttcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggaggcctt
 35 accatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagcc
 ggaaggccgagcgcagaagtggctcgaactttatccgctccatccagcttattaattgttgcgggaagctagagtaagt
 agttcggcagtaataagtttgcgaacgttggcattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgttggatggctcattca

47

gctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggttgcaaaaaagcggtagctcctcggtcctccgatcgt
tgtcagaagtaagtggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatg
cttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatcggcgaccgagttgctcttcccggcgtcaatac
gggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtcatcattggaaaacgttctcggggcggaaaactcgaaggatct
5 taccgctgtgagatccagttc gatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcgttctgggtg
agcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaaggaataagggcgacacggaaatgtgaatactcatactcttcttttc
aatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaaatgtatttagaaaaataaacaataggggtcc
gcgcacattccccgaaaagtgccacctgacgtc

10

P a t e n t k r a v

1.

Prosess for deteksjonen av aktiviteten til γ -sekretase, hvori

5 A. et transgen som koder for et fusjonsprotein blir anvendt, hvori nevnte transgen omfatter:

10 a) en første nukleotidsekvens som koder for et protein som inneholder aminosyresekvensen GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ IDNR. 1), hvori nevnte protein kan kløyves inne i nevnte aminosyresekvens av γ -sekretase som er tilstede i en celle; hvorved et første delprotein, som inneholder aminosyresekvensen GAIIGLMVGGVV (SEQ IDNR. 2), og et andre delprotein som inneholder aminosyresekvensen VIVITLVML (SEQ IDNR. 3) blir dannet;

15 b) ved 5' enden av den første nukleotidsekvensen er det en andre nukleotidsekvens som koder for et signalpeptid;

c) en promoter; og

20 d) ytterligere kodende nukleotidsekvenser som koder for et protein som blir uttrykt som et fusjonsprotein med nevnte første delprotein og nevnte andre delprotein og som blir anvendt for deteksjon av det nevnte andre delprotein, og hvis passende ytterligere ikke-kodende nukleinsyresekvenser;

B. dette transgen blir inkorporert inn i en human celle *in vitro* eller en ikke-human eukaryot celle og fusjonsproteinet blir uttrykt;

25 C. fusjonsproteinet blir kløvet inne i aminosyresekvensen SEQ IDNR. 1 av γ -sekretasen som er tilstede i cellen hvorved det første delprotein og det andre delprotein blir dannet; og

D. det andre delproteinet blir detektert;

k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte fusjonsprotein, med unntak av SEQ IDNR. 1, ikke inneholder en eller flere peptidmotiver som virker som et signal for endo- eller eksocytose og/eller proteasekløvningssete.

30

2.

Prosess for deteksjonen av aktiviteten til γ -sekretase, hvori

A. et transgen som koder for et fusjonsprotein blir anvendt, hvori nevnte transgen inneholder følgende bestanddeler:

- 5 a) en første nukleotidsekvens som koder for et protein som inneholder aminosyresekvensen GAIIGLMVGGVVIATVIVITLVML (SEQ IDNR. 1), hvori nevnte protein kan kløyves inne i nevnte aminosyresekvens av γ -sekretase som er tilstede i en celle; hvorved et første delprotein, som inneholder aminosyresekvensen GAIIGLMVGGVV (SEQ IDNR. 2), og et
- 10 andre delprotein som inneholder aminosyresekvensen VIVITLVML (SEQ IDNR. 3) blir dannet;
- b) ved 5' enden av den første nukleotidsekvensen er det en andre nukleotidsekvens som koder for et signalpeptid;
- c) en promoter; og
- 15 d) ytterligere kodende nukleotidsekvenser som koder for et protein som blir uttrykt som et fusjonsprotein med nevnte første delprotein og nevnte andre delprotein og som blir anvendt for deteksjon av det nevnte andre delprotein, og hvis passende ytterligere ikke-kodende nukleinsyresekvenser;

B. dette transgen blir inkorporert inn i en human celle *in vitro* eller en ikke-human eukaryot celle og fusjonsproteinet blir uttrykt;

20

C. fusjonsproteinet blir kløvet inne i aminosyresekvensen SEQ IDNR. 1 av γ -sekretasen som er tilstede i cellen hvorved det første delprotein og det andre delprotein blir dannet; og

D. mengde av det andre delproteinet blir bestemt og aktiviteten til γ -sekretasen blir bestemt utifra mengde av det andre delprotein som blir dannet;

25

k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte fusjonsprotein, med unntak av SEQ IDNR. 1, ikke inneholder en eller flere peptidmotiver som virker som et signal for endo- eller eksocytose og/eller proteasekløvningssete.

30 3.

Prosess ifølge ett av kravene 1 og 2, **k a r a k t e r i s e r t v e d** at peptidmotivet er et caspasekløvningssete.

4.

35 Prosess ifølge ett av kravene 1 til 3, **k a r a k t e r i s e r t v e d** at den første nukleotidsekvensen koder for et amyloidforløperprotein (APP) eller en del

derav, hvori nevnte peptidmotiv som virker som et signal for endo- eller eksocytose er NPTY og nevnte peptidmotiv som virker som et proteasekløyningssete er VEVD.

5.

5 Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 4, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den første nukleotidsekvensen koder for et protein som er utledet fra
aminosyresekvensen SEQ IDNR. 4.

6.

10 Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 5, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den andre nukleotidsekvensen koder for signalpeptidet til humant APP
(SEQ IDNR. 5), SUC2 (SEQ IDNR. 12) eller BM40 (SEQ IDNR. 13).

7.

15 Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 6, k a r a k t e r i s e r t
v e d at signalpeptidet har aminosyresekvensen SEQ IDNR. 5.

8.

20 Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 7, k a r a k t e r i s e r t
v e d at promoteren er en promoter for ekspresjon i pattedyrceller, i *C. elegans*, i
gjær eller i *Drosophila*.

9.

25 Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 8, k a r a k t e r i s e r t
v e d at promoteren er CMV, HSV TK, RSV, SV40, LTR, unc119, unc54, hsp16-2,
G₀A1, sel-12, ADH1, GAL1, MET3, MET25, MT, Ac5 eller Ds47-promoter.

10.

30 Prosess ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at cellen er en
HeLa, 293, H4, SH-SY5Y, H9, Cos, CHO, N2A, SL-2 eller gjær-celle.

11.

Prosess ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at cellen er en
C. elegans-celle.

12.

Prosess ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at cellen er en bestanddel av en transgen *C. elegans*.

5 13.

Prosess ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at cellen er en *Saccharomyces cerevisiacelle*.

14.

10 Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at fusjonsproteinet inneholder aminosyresekvensen SEQ IDNR. 6.

15.

15 Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere kodende nukleotidsekvensen er lokalisert i den 3' enden av den første nukleotidsekvensen.

16.

20 Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere kodende nukleotidsekvensen koder for et protein som inneholder et DNA-bindende domene og et transkripsjonsaktiverende domene.

17.

25 Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere kodende nukleotidsekvensen koder for et protein som består av et GAL4-bindende domene og av det transkripsjonsaktiverende domenet til VP16 (GAL4-VP16).

18.

30 Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at cellen er kotransfektet med et reporterplasmid hvor reporterplasmidet inneholder et reportergen under kontrollen av en regulerbar promoter.

19.

35 Prosess ifølge krav 18, k a r a k t e r i s e r t v e d at den regulerbare promoteren er aktiverbar av det transkripsjonsaktiverende domenet.

20.

Prosess ifølge krav 19, k a r a k t e r i s e r t v e d at reporterplasmidet koder for reporter-genet for EGFP (forsterket grønt fluoriserende protein), Ura 3, His 3 eller Lac Z og at den regulerbare promoteren inneholder GAL4-
5 bindende seter og en minimal promoter til HIV.

21.

Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 20, k a r a k t e r i s e r t
v e d at transgenet omfatter en nukleotidsekvens som koder for SEQ IDNR. 14.
10

22.

Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 21, k a r a k t e r i s e r t
v e d at transgenet er tilstede i en vektor.

15 23.

Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 22, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den rekombinante vektoren er pcDNA 3.1+.

24.

20 Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 23, k a r a k t e r i s e r t
v e d at ingen endogen γ -sekretaseaktivitet er detekterbar i cellen.

25.

Prosess ifølge ett eller flere av kravene 1 til 24, k a r a k t e r i s e r t
25 v e d at cellen er kotransfektet ved å anvende et cDNA-bibliotek.

26.

Prosess ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at cDNA
laget fra humant eller ikke-humant vev eller humane eller ikke-humane celler er tilstede
30 i cDNA-biblioteket.

27.

Anvendelsen av en prosess ifølge ett eller flere av kravene 24 til 26 for identifisering av
et cDNA som koder for en γ -sekretase, et subenhetsprotein av γ -sekretase eller en γ -
35 sekretaselignende protease hvori

- a) en celle er identifisert hvor aktiviteten av en γ -sekretase er detekterbar og
- b) cDNA som koder for γ -sekretasen er isolert fra denne celle.

SEQUENCE LISTING

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

<120> Improved A β -Peptide screening assay

<130> DEAV2003/0046

<140>

<141>

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: APP fragment

<400> 1

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val

1 5 10 15

Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu

20

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: APP fragment

<400> 2

Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

1 5 10

<210> 3

<211> 9

<400> 5

Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
 1 5 10 15

Ala

<210> 6

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: C55 fragment

<400> 6

Leu Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln
 1 5 10 15

Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile
 20 25 30

Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile
 35 40 45

Thr Leu Val Met Leu Lys Lys
 50 55

<210> 7

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: GAL4-VP16

<400> 7

Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu
 1 5 10 15

Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu
 20 25 30

<400> 8

ggcaaggctt gaccgacaat tgcatagaaga atctgcttag ggtaggcgt tttgcgctgc 60
 ttccgcgatgt acggggccaga tatacgcggtt gacattgatt attgactagt tattaatagt 120
 aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcggt acataactta 180
 cggtaaattgg cccgcctggc tgaccgcca acgacccccg cccattgacg tcaataatga 240
 cgtatgttcc catagtaacg ccaatagggga ctttccattg acgtcaatgg gtggactatt 300
 tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaaagt acgcccccta 360
 ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct ggcattatgc ccagtacatg accttatggg 420
 actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggg 480
 tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc 540
 accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcaccgcgt gtacgggagg aggtctatat 600
 aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac tggcttatcg aaattaatac 660
 gactcactat agggagacc aagctggcta gcgtttaaac ttaagcttca cagctagcgc 720
 actcgggtgcc ccgcgcaggg tcgcgatgct gcccggttg gcaactgttc tgctggccgc 780
 ctggacggct cgggcgctgg atgcagaatt ccgacatyac tcaggatatg aagttcatca 840
 tcaaaaattg gtgttctttg cagaagatgt gggttcaaac aaagggtcaa tcattggact 900
 catggtgggc ggtgtgtgca tagcgacagt gatcgtcatc accttgggta tgctgaagaa 960
 gaaacagtac acatccattc atcatgggtg ggtggaggtt gacgccgctg tcacccaga 1020
 ggagcggccac ctgtccaaga tgcagcagaa cggctacgaa aatccaacct acaagttctt 1080
 tgagcagatg cagaacgcgc ggggtacccc ggcgatgaag ctactgtctt ctatcgaaca 1140
 agcatgcgat atttgccgac ttaaaaagct caagtgtcc aaagaaaaac cgaagtgcgc 1200
 caagtgtctg aagaacaact gggagtgtcg ctactctccc aaaacaaaaa ggtctccgct 1260
 gactagggca catctgacag aagtggaatc aaggctagaa agactggaac agctatttct 1320
 actgattttt cctcgagaag accttgacat gattttgaaa atggattctt tacaggatat 1380
 aaaagcattg ttaacaggat tatttgtaca agataatgtg aataaagatg ccgtcacaga 1440
 tagattggct tcagtggaga ctgatatgcc tctaaccattg agacagcata gaataagtgc 1500
 gacatcatca tcggaagaga gtagtaacaa aggtcaaaga cagttgactg tatcgccgga 1560
 attccccggg atctgggccc ccccgaccga tgtcagcctg ggggacgagc tccacttaga 1620
 cggcgaggac gtggcgatgg cgcagccga cgcgctagac gatttcgatc tggacatggt 1680
 gggggacggg gattccccgg ggcgggatt tccccccac gactccgcc cctacgggcg 1740
 tctggatatg gccgacttcg agtttgagca gatgtttacc gatgccttg gaattgacga 1800
 gtacgggagg tag 1813

<210> 9

<211> 3354

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

agtttctctg gcagcggtag gcgagagcac gggaggagc gtgcgcgggg gccccgggag 60
 acggcgggcg tggcgggcg ggcagagcaa ggacgcggcg gatccactc gcacagcagc 120
 gcactcgggtg ccccgccag ggtcgcgatg ctgcccgggt tggcactgct cctgctggcc 180
 gcctggacgg ctccggcgct ggaggtaccc actgatggta atgctggcct gctggctgaa 240
 ccccagattg ccatgttctg tggcagactg aacatgcaca tgaatgtcca gaatgggaag 300
 tgggattcag atccatcagg gacaaaaacc tgcattgata ccaaggaagg catcctgcag 360
 tattgccaag aagtctaccc tgaactgcag atcaccaatg tggtagaagc caaccaacca 420

ttcaatttgt ataaaatggt gttttcatgt aaataaatac attccttgag gagg 3354

<210> 10

<211> 8331

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: recombinant
plasmid

<400> 10

acgaaagggc ctcgtgatac gcctatTTTT ataggTTaat gtcataGataa taatggTTtc 60
 ttaggacgga tcgcttgCct gtaactTaca cgcgcctcgt atctTTtaaat gatggaataa 120
 tttgggaatt tactctgtgt ttatttattt ttatgTTttg tatttgGatt ttagaaagta 180
 aataaagaag gtagaagagt tacggaatga agaaaaaaaa ataaacaaag gTTtaaaaaa 240
 tttcaacaaa aagcgtactt tacatatata tttattagac aagaaaagca gattaaatag 300
 atatacattc gattaacgat aagTaaaatg taaaatcaca ggattTTcgt gtgtggTctt 360
 ctacacagac aagatgaaac aattcggcat taatacctga gagcaggaag agcaagataa 420
 aaggtagtat ttgttgGcga tccccctaga gtctTTtaca tcttcggaaa acaaaaaacta 480
 tttttctttt aatttctttt tttactttct atTTTTaatt tataatTTta tattaaaaaa 540
 tttaaattat aattattttt atagcacgtg atgaaaagga cccaggtggc actTTtcggg 600
 gaaatgtgcg cggaaccctt atTTgTTtat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc 660
 tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatctgc agctctggcc cgtgtctcaa 720
 aatctctgat gttacattgc acaagataaa aatatatcat catgaacaat aaaactgtct 780
 gcttacataa acagtaatac aaggggtggt atgagccata ttcaacggga aacgtcttgc 840
 tggaggccgc gattaaattc caacatggat gctgatttat atgggtataa atgggctcgc 900
 gataatgtcg ggcaatcagg tgcgacaatc tttcgattgt atgggaagcc cgatgcgcca 960
 gagttgTTtc tgaaacatgg caaaggtagc gttgccaatg atgttacaga tgagatggtc 1020
 agactaaact ggctgacgga atttatgcct cttccgacca tcaagcattt tatccgtact 1080
 cctgatgatg catggttact caccactgcg atccgcggga aaacagcatt ccaggTatta 1140
 gaagaatata ctgattcagg tgaaaatatt gttgatgcgc tggcagtgtt cctgcgccgg 1200
 ttgcattcga ttctgtttg taattgtcct tttaacagcg atcgcgtatt tcgtctcget 1260
 caggecgaat cacgaatgaa taacggTTtg gttgatgcga gtgattttga tgacgagcgt 1320
 aatggctggc ctgTTgaaca agtctggaaa gaaatgcata cgctTTtgcc attctcaccg 1380
 gattcagtcg tcaactcatg tgatttctca cttgataacc ttattTTtga cgaggggaaa 1440
 ttaataggTT gTattgatgt tggacgagtc ggaatcgcag accgatacca ggatcttgcc 1500
 atcctatgga actgcctcgg tgagTTttct cttcattac agaaacggct tttTcaaaaa 1560
 tatggtattg ataatcctga tatgaataaa ttgcagTTtc atttgatgct cgatgagTTt 1620
 ttctaatacag aattggTTaa ttggTTgtaa cactggcaga gcattacgct gacttgacgg 1680
 gacggcgcac gaccaaaaat ccttaacgtg agTTttcgtt ccactgagcg tcagacccccg 1740
 tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgcgtaate tgctgcttgc 1800
 aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggTgg tttgTTtgcc ggatcaagag ctaccaactc 1860
 tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt 1920
 agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc 1980
 taatcctgTT accagtggtt gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggTTggact 2040
 caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggg tcgtgcacac 2100

catcatggtg tggaggagt tgacgcccgt gtcaccccag aggagcgcca cctgtccaag 5040
atgcagcaga acggctacga aatccaacc tacaagttct ttgagcagat gcagaacgcg 5100
cggggtacc cggcgatgaa gctactgtct tctatcgaac aagcatgcca tatttgccga 5160
cttaaaaagc tcaagtgtc caaagaaaa ccgaagtgcg ccaagtgtct gaagaacaac 5220
tgggagtgtc gctactctcc caaaaccaa aggtctccgc tgactagggc acatctgaca 5280
gaagtggat caaggctaga aagactggaa cagctatttc tactgatttt tcctcgagaa 5340
gacctgaca tgattttgaa aatggattct ttacaggata taaaagcatt gttaacagga 5400
ttatttgtac aagataatgt gaataaagat gccgtcacag atagattggc ttcagtggag 5460
actgatatgc cttaacatt gagacagcat agaataagt cgacatcatc atcggagag 5520
agtagtaaca aaggtcaaag acagttgact gtatcgccgg aattcccggg gatctgggccc 5580
ccccgaccg atgtcagcct gggggacgag ctccacttag acggcgagga cgtggcgatg 5640
gcgcatgccc acgcgctaga cgatttcgat ctggacatgt tgggggacgg ggattccccg 5700
gggcccggat ttacccccca cgactccgcc cctacggcg ctctggatat ggcccacttc 5760
gagtttgagc agatgtttac cgatgccctt ggaattgacg agtacggtgg gtagggatcc 5820
actagtcagc tgtggtggaa ttctgcagat atccagcaca gtggcgggccg ctcgaccccg 5880
ggtgctagca aggccttgtg gccagccatg gcaactagt cggccgctaa gtaagtaaga 5940
cgtcgagctc taagtaagta acggccgcca ccgcggtgga gctttggact tcttcgccag 6000
aggtttggtc aagtctcaa tcaaggttgt cggcttgtct accttgccag aaatttacga 6060
aaagatggaa aagggtcaaa tcggtggtag atacgttgtt gacacttcta aataagcga 6120
tttcttatga tttatgatt ttattattaa ataagttata aaaaaataa gtgtataca 6180
attttaagt gactcttagg ttttaaacg aaaattcttg tcttgagta actcttct 6240
gtaggtcagg ttgctttctc aggtatagca tgaggtcgct cttattgacc acacctctac 6300
cggcatgccc agcaaatgcc tgcaaatcgc tccccatttc acccaattgt agatagcta 6360
actccagcaa tgagttgatg aatctcgtg tgtattttat gtcctcagag gacaatacct 6420
gttgtaatcg ttcttcaca cggatcccaa ttcgccctat agtgagtcgt attacaattc 6480
actggccgtc gttttacaac gtcgtgacty gaaaaccct ggcgttacc aacttaatcg 6540
ccttgagca catccccct tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg 6600
ccctcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggacg cgccctgtag cggcgatta 6660
agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg 6720
cccgctcctt tcgctttctt ccctccttt ctgcacagc tcgcccgtt tccccgtaa 6780
gctctaaate gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc 6840
aaaaaacttg attagggtga tggttcacgt agtgggccat cgccctgata gacggttttt 6900
cgcccttga cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca 6960
aactcaacc ctatctcggc ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc 7020
tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa caaatatta 7080
acgtttacaa tttcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgoggt atttcacacc 7140
gcaggcaagt gcacaaacaa tacttaata aatactactc agtaataacc tatttcttag 7200
catttttgac gaaatttgct attttgtag agtcttttac accatttgtc tccacacctc 7260
cgcttacatc aacaccaata acgccattta atctaagcgc atcaccaaca ttttctggcg 7320
tcagtccacc agctaacata aaatgtaagc tttcggggct ctcttgccct ccaaccagc 7380
cagaaatcga gttccaatcc aaaagttcac ctgtcccacc tgcttctgaa tcaacaagg 7440
gaataaacga atgaggtttc tgtgaagctg cactgagtag tatgttgag tcttttgaa 7500
atacgagtct ttaataaact ggcaaaccga ggaactcttg gtattcttgc cacgactcat 7560
ctccatgcag ttggacgata tcaatgccgt aatcattgac cagagccaaa acatcctcct 7620
taggttgatt acgaaacag ccaaccaagt atttcggagt gcctgaacta tttttatag 7680
ctttacaag acttgaaatt ttccttgcaa taaccggggtc aattgttctc tttctattgg 7740
gcacacatat aataccagc aagtcagcat cggaatctag agcacattct gggcctctg 7800
tgctctgcaa gccgcaact ttcaccaatg gaccagaact acctgtgaaa ttaataacag 7860

Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His
 165 170 175

Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu
 180 185 190

Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser
 195 200 205

Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn
 210 215 220

Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp
 225 230 235 240

Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser
 245 250 255

Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Pro Glu
 260 265 270

Phe Pro Gly Ile Trp Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu
 275 280 285

Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu
 290 295 300

Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro
 305 310 315 320

Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala
 325 330 335

Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu
 340 345 350

Tyr Gly Gly
 355

<210> 12

<211> 22

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 12

Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys
85 90 95

Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp
100 105 110

Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala
115 120 125

His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe
130 135 140

Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp
145 150 155 160

Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp
165 170 175

Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr
180 185 190

Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser
195 200 205

Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Pro
210 215 220

Glu Phe Pro Gly Ile Trp Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp
225 230 235 240

Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala
245 250 255

Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly
260 265 270

Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met
275 280 285

Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp
290 295 300

Glu Tyr Gly Gly
305

gccacgttcg ccggccttcc ccgtcaagct ctaaatcggg gcatcccttt agggttccga 2400
 tttagtgctt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt aggggtgatgg ttcacgtagt 2460
 gggccatcgc cctgatagac gggttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat 2520
 agtggactct tgttccaaac tggaacaaca ctcaacccta tctcggctta ttcttttgat 2580
 ttataaggga ttttggggat ttccggcctat tgggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa 2640
 tttaacgcga attttaacaa aatattaacg tttacaattt aaatatttgc ttatacaatc 2700
 ttectgtttt tggggctttt ctgattatca accgggggtgg gtaccgagct cgaattctgt 2760
 ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt cccagggtc cccaggcagg cagaagtatg 2820
 caaagcatgc actcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg ctccccagca 2880
 ggcagaagta tgcaaacgat gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc gccccctaact 2940
 ccgccatcc cggccctaac tccgcccagt tccgccatt ctccgccccca tggctgacta 3000
 atttttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt ccagaagtag 3060
 tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc tcccgggagc ttggatatcc 3120
 attttcggat ctgatcaaga gacaggatga ggatcgtttc gcatgattga acaagatgga 3180
 ttgcacgcag gttctccggc cgcttgggtg gagaggctat tccgctatga ctgggcacaa 3240
 cagacaatcg gctgctctga tgccgccgtg ttccggctgt cagcgcaggg gcgcccgggt 3300
 ctttttgtca agaccgacct gtccggtgcc ctgaatgaac tgcaggacga ggcagcgcgg 3360
 ctatcgtggc tggccacgac gggcgttcc tgcgcagctg tgctcgacgt tgtcactgaa 3420
 gcgggaaggg actggctgct attgggcgaa gtgcccggggc aggatctcct gtcactcac 3480
 cttgctcctg ccgagaaagt atccatcatg gctgatgcaa tgcggcggct gcatacgtt 3540
 gatccggcta cctgccatt cgaccaccaa gcgaaacatc gcatcgagcg agcacgtact 3600
 cggatggaag ccggtcttgt cgatcaggat gatctggacg aagagcatca ggggctcgcg 3660
 ccagccgaac tgttcgccag gctcaaggcg cgcatgcccg acggcgagga tctcgtcgtg 3720
 acccatggcg atgcctgctt gccgaatata atgggtggaaa atggccgctt ttctggattc 3780
 atcgactgtg gccggctggg tgtggcggac cgctatcagg acatagcgtt ggctaccctg 3840
 gatattgctg aagagcttgg cggcgaatgg gctgaccgct tcctcgtgct ttacggtatc 3900
 gccgctcccg attcgcagcg catgccttc tatgccttc ttgacgagtt cttctgagcg 3960
 ggactctggg gttcgaatg accgaccaag cgacgccccaa cctgccatca cgagatttcg 4020
 attccaccgc cgccttctat gaaagggttg gcttcggaaat cgttttccgg gacgcccggct 4080
 ggatgatcct ccagcgcggg gatctcatgc tggagtctt cggccacccc aacttgttta 4140
 ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat 4200
 ttttttact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct 4260
 ggatcccgtc gacctcgaga gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa 4320
 ttgttatccg ctcaaatc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg 4380
 ggggtgcctaa tgagttagct aactcacatt aattgcgttg cgtcactgc ccgctttcca 4440
 gtcgggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg 4500
 tttgcgtatt gggcgtctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct cggctcgttcg 4560
 gctgcggcga gcggtatcag ctcaactcaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg 4620
 ggataacgca ggaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 4680
 ggcgcgcttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg 4740
 acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc 4800
 tggaaagctc ctctgctcct ctctgttcc gacctgccg ctaccggat acctgtccgc 4860
 cttctcctc tgggaagcg tggcgtttc tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc 4920
 ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccagccg 4980
 ctgcccctta tccggtaact atcgtcttga gtccaaccgg gtaagacacg acttatcgc 5040
 actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 5100
 gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc 5160
 tctgctgaag ccagttacct tgggaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac 5220

cgataatgtc gggcaatcag gtgcgacaat ctttcgattg tatgggaagc cccgatgcgcc 960
 agagttgttt ctgaaacatg gcaaaggtag cgttgccaat gatgttacag atgagatggt 1020
 cagactaaac tggtgacgg aatttatgcc tcttcgacc atcaagcatt ttatccgtac 1080
 tccatgatgat gcatggttac tcaccactgc gatccgcggg aaaacagcat tccaggtatt 1140
 agaagaatat cctgattcag gtgaaaatat tgttgatgag ctggcagtggt tccatgcgcc 1200
 gttgcattcg attcctgttt gtaattgtcc ttttaacagc gatcgcgtat ttcgtctcgc 1260
 tcaggcgcaa tcacgaatga ataacggttt ggttgatgag agtgattttg atgacgagcg 1320
 taatggctgg cctggtgaac aagtctggaa agaaatgcat acgcttttgc cattctcacc 1380
 ggattcagtc gtcactcatg gtgatttctc acttgataac cttatttttg acgaggggaa 1440
 attaataagg tgtattgatg ttggacgagt cggaaatcgca gaccgatacc aggatcttgc 1500
 catcctatgg aactgcctcg gtgagttttc tccctcatta cagaaacggc tttttcaaaa 1560
 atatggtatt gataatcctg atatgaataa attgcagttt catttgatgc tcgatgagtt 1620
 tttctaatca gaattggtta attggttgta aactggcag agcattacgc tgacttgacg 1680
 ggacggcgca tgacaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc 1740
 gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttcc tgcgcgtaat ctgctgcttg 1800
 caaacaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact 1860
 ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg 1920
 tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctcg 1980
 ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgagc 2040
 tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca 2100
 cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga 2160
 gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc 2220
 ggaacaggag agcgcacgag ggagctcca ggggggaaac cctggtatct ttatagtcct 2280
 gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc agggggggccg 2340
 agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggc tccctggcctt ttgctggcct 2400
 tttgctcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc 2460
 tttgagtgag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc 2520
 gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcggtg gccgattcat 2580
 taatgcagct ggcacgacag gtttcccgc tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt 2640
 aatgtgagtt acctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcct 2700
 atgttggtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat 2760
 tacgccaagc tcggaattaa ccctcactaa agggaaacaaa agctggtaac gatcccagc 2820
 tttgcaaat aaagccttcg agcgtcccaa aaccttctca agcaaggttt tcagtataat 2880
 gttacatgag tacacgcgtc tgtacagaaa aaaaagaaaa atttgaaata taaataacgt 2940
 tcttaatact aacataacta taaaaaata aatagggacc tagacttcag gttgtctaac 3000
 tccttcctt tcggttagag cggatgtggg gggagggcgt gaatgtaagc gtgacataac 3060
 taattacatg atatcgacaa aggaaaagg gctgttttac tcacaggctt ttttcaagta 3120
 ggtaattaag tcgtttctgt ctttttccct cttcaacca ccaaaggcca tcttggtact 3180
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 3240
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttcatagaa ataatacaga agtagatgtt 3300
 gaattagatt aaactgaaga tatataattt attggaaaat acatagagct ttttgttgat 3360
 gcgcttaagc gatcaattca acaacaccac cagcagctct gattttttct tcagccaact 3420
 tggagacgaa tctagcttg acgataactg gaacatttg aattctacc ttaccaaga 3480
 tcttaccgta accggctgcc aaagtgtcaa taactggagc agtttcctta gaagcagatt 3540
 tcaagtattg gtctctcttg tcttctggga tcaatgtcca caatttctcc aagtcaaga 3600
 ctggcttcca gaaatgagct tgttgcttgt ggaagtatct cataccaacc ttaccgaaat 3660
 aacctggatg gtatttatcc atgttaattc tgtggatgat ttgaccaccg gccatacctc 3720
 taccaccggg gtgctttctg tgcttaccga tacgacctt accggctgag acgtgacctc 3780

```

gctttcttcc ctctctttct cgcacggtc gccggcttcc cccgtcaagc tctaaatcgg 6720
gggctccctt tagggttccg attagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat 6780
tagggatgat gttcacgtag tgggcatcg cctgataga cggtttttcg ccctttgacg 6840
ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct 6900
atctcggctc attcttttga tttataaggg attttgccga ttccggccta ttggttaaaa 6960
aatgagctga tttacaataa atttaacgcg aattttaaca aatatataac gtttacaatt 7020
tcctgatgcy gtattttctc cttacgcatc tgtgcggtat ttcacaccgc aggcaagtgc 7080
acaaacaata cttaataaaa tactactcag taataaccta tttcttagca tttttgacga 7140
aatttgctat ttgtttagag tcttttaaac catttgctc cacacctccg cttacatcaa 7200
caccaataac gccatttaat ctaagcgcac caccaacatt ttctggcgtc agtccaccag 7260
ctaacataaa atgtaagctt tcggggctct cttgccttcc aaccagctca gaaatcgagt 7320
tccaatccaa aagttcacct gtcccactg cttctgaatc aaacaagga ataaacgaat 7380
gaggtttctg tgaagctgca ctgagtagta tgttgacgct ttttggaat acgagctctt 7440
taataactgg caaacggagg aactcttggc attcttgcca cgactcatct ccatgcagtt 7500
ggacgatatc aatgccgtaa tcattgacca gagccaaaac atcctcctta ggttgattac 7560
gaaacacgcu aaccaagtat ttcggagtgc ctgaactatt tttatatgct tttacaagac 7620
ttgaaatctt ccttgcaata accgggtcaa ttgttctctt tctattgggc acacataaa 7680
taccagcaa gtcagcatcg gaatctagag cacattctgc ggcctctgtg ctctgcaagc 7740
cgcaaacttt caccaatgga ccagaactac ctgtgaaatt aataacagac atactccaag 7800
ctgcctttgt gtgcttaatc acgtatactc acgtgctcaa tagtcaccaa tgcctccct 7860
cttggccctc tccttttctt ttttcgaccg aattaattct taatcggcaa aaaagaaaa 7920
gctccggatc aagattgtac gtaaggtgac aagctatctt tcaataaaga atatcttcca 7980
ctactgcat ctggcgtcat aactgcaaag tacacataata ttacgatgct gtctattaaa 8040
tgcttctat attatatata tagtaatgct gtttatggtg cactctcagt acaatctgct 8100
ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac 8160
gggcttgtct gctcccgca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca 8220
tgtgtcagag gtttccaccg tcatcaccga aacgcgcga 8259

```

<210> 17

<211> 1089

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Mutagen

<400> 17

```

atgcttttgc gagcttttct tttctctctg gctggttttg cagccaaaat atctgcagcg 60
ctagctgatg cagaattccg acatgactca ggatatgaag ttcacatca aaaattgggt 120
ttctttgacg aagatgtggg ttcaaacaaa ggtgcaatca ttggactcat ggtgggagggt 180
gttgatcatg cgacagtgat cgtcatcacc ttggatgatc tgaagaagaa aggtgatct 240
ggcaagctac tgtcttctat cgaacaagca tgcgatattt gccgacttaa aaagctcaag 300
tgctccaaag aaaaaccgaa gtgcgccaag tgtctgaaga acaactggga gtgtcgctac 360
tctcccaaaa ccaaaaggtc tccgctgact agggcacatc tgacagaagt ggaatcaagg 420
ctagaaagac tggaacagct atttctactg atttttcctc gagaagacct tgacatgatt 480
ttgaaaatgg attctttaca ggatataaaa gcattgttaa caggattatt tgtacaagat 540
aatgtgaata aagatgccgt cacagataga ttggcttcag tggagactga tatgcctcta 600

```

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 145 | 150 | 155 | 160 |
| Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu | 165 | 170 | 175 |
| Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala | 180 | 185 | 190 |
| Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser | 195 | 200 | 205 |
| Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu | 210 | 215 | 220 |
| Thr Val Ser Pro Glu Phe Pro Gly Ile Trp Ala Pro Pro Thr Asp Val | 225 | 230 | 235 |
| Ser Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala | 245 | 250 | 255 |
| His Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly | 260 | 265 | 270 |
| Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly | 275 | 280 | 285 |
| Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala | 290 | 295 | 300 |
| Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly Gly Thr Ser Gly Gln Tyr Thr Ser | 305 | 310 | 315 |
| Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu | 325 | 330 | 335 |
| Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr | 340 | 345 | 350 |
| Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn Gly Ala | 355 | 360 | |

<210> 19

<211> 1080

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu
85 90 95

Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr
100 105 110

Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn Ala Arg Gly Thr Pro Ala Met
115 120 125

Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys
130 135 140

Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys
145 150 155 160

Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu
165 170 175

Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu
180 185 190

Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu
195 200 205

Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe
210 215 220

Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser
225 230 235 240

Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala
245 250 255

Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr
260 265 270

Val Ser Pro Glu Phe Pro Gly Ile Trp Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser
275 280 285

Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His
290 295 300

Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp
305 310 315 320

Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala
325 330 335

Ala Ala Pro Leu Ala Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu
20 25 30

Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn
35 40 45

Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
50 55 60

Val Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser
65 70 75 80

Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu
85 90 95

Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr
100 105 110

Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn Ala Arg Gly Thr Pro Ala Met Lys
115 120 125

Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys
130 135 140

Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn
145 150 155 160

Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr
165 170 175

Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu Glu Gln
180 185 190

Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys
195 200 205

Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val
210 215 220

Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val
225 230 235 240

Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser Ala Thr
245 250 255

Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val
260 265 270

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 25

actatatcta gaatgctttt gc

22

<210> 26

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 26

ttcgatagaa gacagtagct tgccagatct acctttcttc ttcagcatca ccaa

54

<210> 27

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 27

ttggtgatgc tgaagaagaa aggtagatct ggcaagctac tgtcttctat cgaa

54

<210> 28

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer

<400> 28

atgatgaatg gatgtgtact ggccactagt acccccaccg tactcgtcaa tt

52

<210> 29

<211> 52

gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata 300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcg tggctgaccg cccaacgacc 360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
tcgtattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780
gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
ctgcttaact ggcttatcga aattaatacg actcactata gggagaccca agcttctgcc 900
tgccgcctgc ctgctgcca ctgagggttc ccagcaccat gagggcctgg atcttctttc 960
tcctttgcct ggccgggagg gctctggcag ccccgctagc tgatgcagaa ttccgacatg 1020
actcaggata tgaagttcat catcaaaaat tgggtttctt tgcagaagat gtgggttcaa 1080
acaaaggtgc aatcattgga ctcatggtgg gcggtgttgt catagcgaca gtgatcgtca 1140
tcaccttggg gatgctgaag aagaaagta gatctggcaa gctactgtct totatcgaa 1200
aagcatgcga tatttgccga cttaaaaagc tcaagtgtc caaagaaaaa ccgaagtgcg 1260
ccaagtgtct gaagaacaac tgggagtgtc gctactctcc caaaaccaa aggtctccgc 1320
tgactagggc acatctgaca gaagtggaat caaggctaga aagactggaa cagctatttc 1380
tactgatttt tcctcgagaa gaccttgaca tgattttgaa aatggattct ttacaggata 1440
taaaagcatt gtaaacagga ttatttgtac aagataatgt gaataaagat gccgtcacag 1500
atagattggc ttcagtggag actgatatgc ctctaacatt gagacagcat agaataagtg 1560
cgacatcatc atcgggaagag agtagtaaca aaggtcaaag acagttgact gtatcgccgg 1620
aattcccggg gatctgggcc cccccgacc atgtcagcct gggggacgag ctccacttag 1680
acggcgagga cgtggcgatg gcgcatgcc acgcgctaga cgatttcgat ctggacatgt 1740
tgggggacgg ggattccccg gggccgggat ttacccccca cgactccgcc ccctacggcg 1800
ctctggatat ggccgacttc gagtttgagc agatgtttac cgatgccctt ggaattgacg 1860
agtacgggtg gggacttagt ggccagtaca catccattca tcatggtgtg gtggaggttg 1920
acgcccgtgt caccagag gagcgccacc tgtccaagat gcagcagaa ggctacgaaa 1980
atccaaccta caagttcttt gagcagatgc agaacggcgc ctagggatcc cccgggctgc 2040
aggaattcga tatcaagctt atcgataccg tcgagggcgc tcgagcatgc atctagaggg 2100
ccctattcta tagtgtcacc taaatgctag agctcgtga tcagcctcga ctgtgccttc 2160
tagttgccag ccactctgtt tttgcccctc ccccgctgct tccttgacc tggaaggtgc 2220
cactcccact gtcctttct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg 2280
tcattctatt ctggggggtg ggggtgggca ggacagcaag ggggaggatt gggaagaaa 2340
tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatggaacca gctggggctc gaggggggat 2400
ccccacgccc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg tgggtggttac gcgcagcgtg 2460
accgctacac ttgccagcgc cctagcgcgc gctcctttcg ctttcttccc ttcctttctc 2520
gccagttcg cgggctttcc ccgtcaagct ctaaactggg gcacccctt agggttccga 2580
tttagtgctt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt aggtgatgg ttcacgtagt 2640
gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt tggagtcac gttctttaat 2700
agtggactct tgttccaaac tggaaacaaca ctcaacccta tctcggctca tctctttgat 2760
ttataagga ttttggggat ttcggcctat tgggtaaaa atgagctgat ttaacaaaa 2820
tttaacgca attttaacaa aatattaacg tttacaattt aatatttgc ttatacaatc 2880
ttcctgtttt tggggctttt ctgattatca accggggtgg gtaccgagct cgaattctgt 2940
ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt cccaggtc cccaggcagg cagaagtatg 3000
caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtcccagg ctcccagca 3060
ggcagaagta tgcaaacat gcactcaat tagtcagcaa ccatagtccc gccctaact 3120

ctcoggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atggtgtgca aaaaagcggg 6060
tagctccttc ggtcctccga tcggtgtcag aagtaagttg gccgcagtgt taccactcat 6120
ggttaraggca gcaactgcata attctcttac tgtcatgccca tccgtaagat gcttttctgt 6180
gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagttg atgcggcgac cgagttgctc 6240
ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat 6300
cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 6360
ttcgatgtaa cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 6420
ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggataa gggcgacacg 6480
gaaatggtga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 6540
ttgtotcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc 6600
gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtc 6634

1/4

Fig. 1:

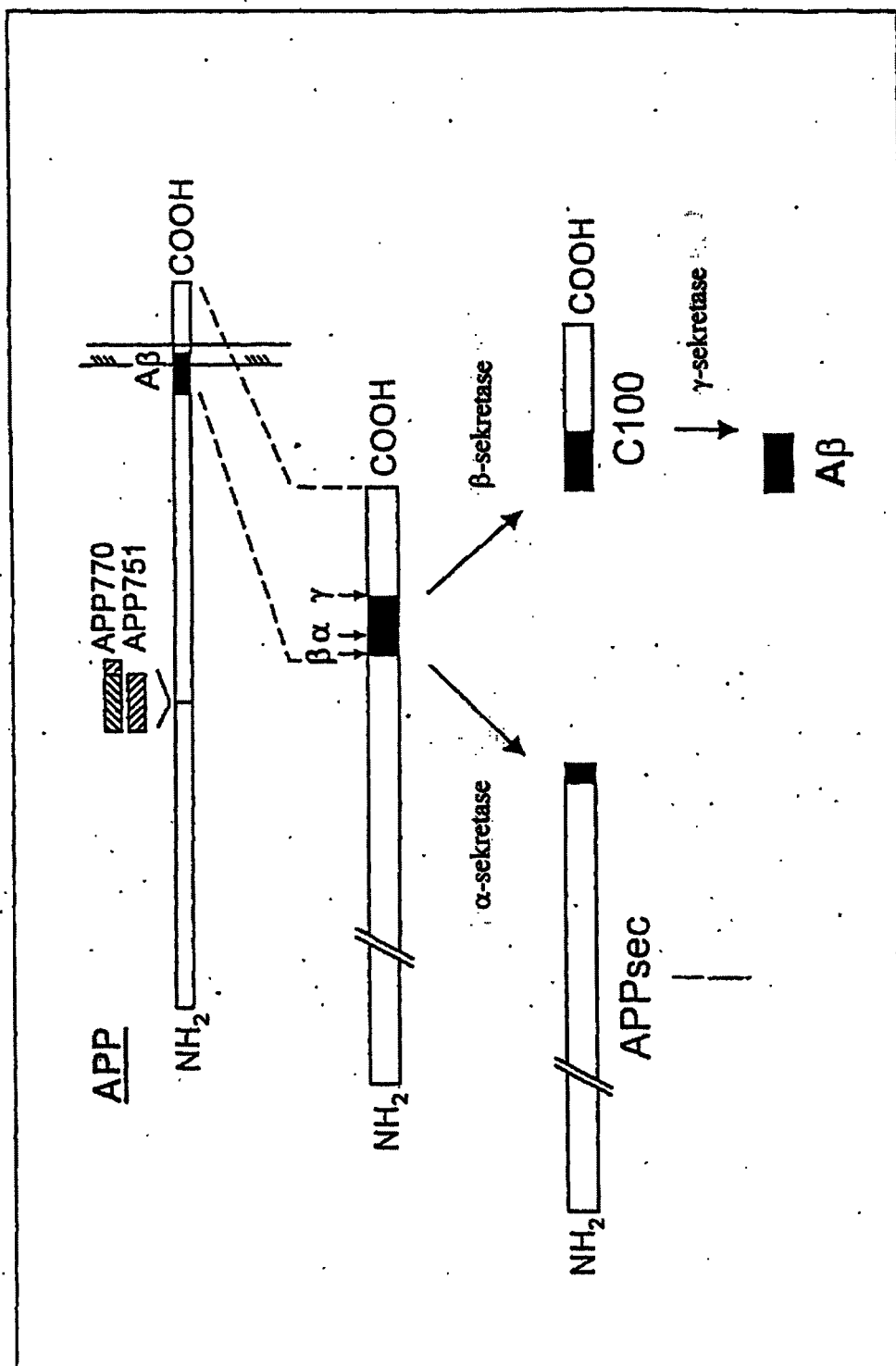
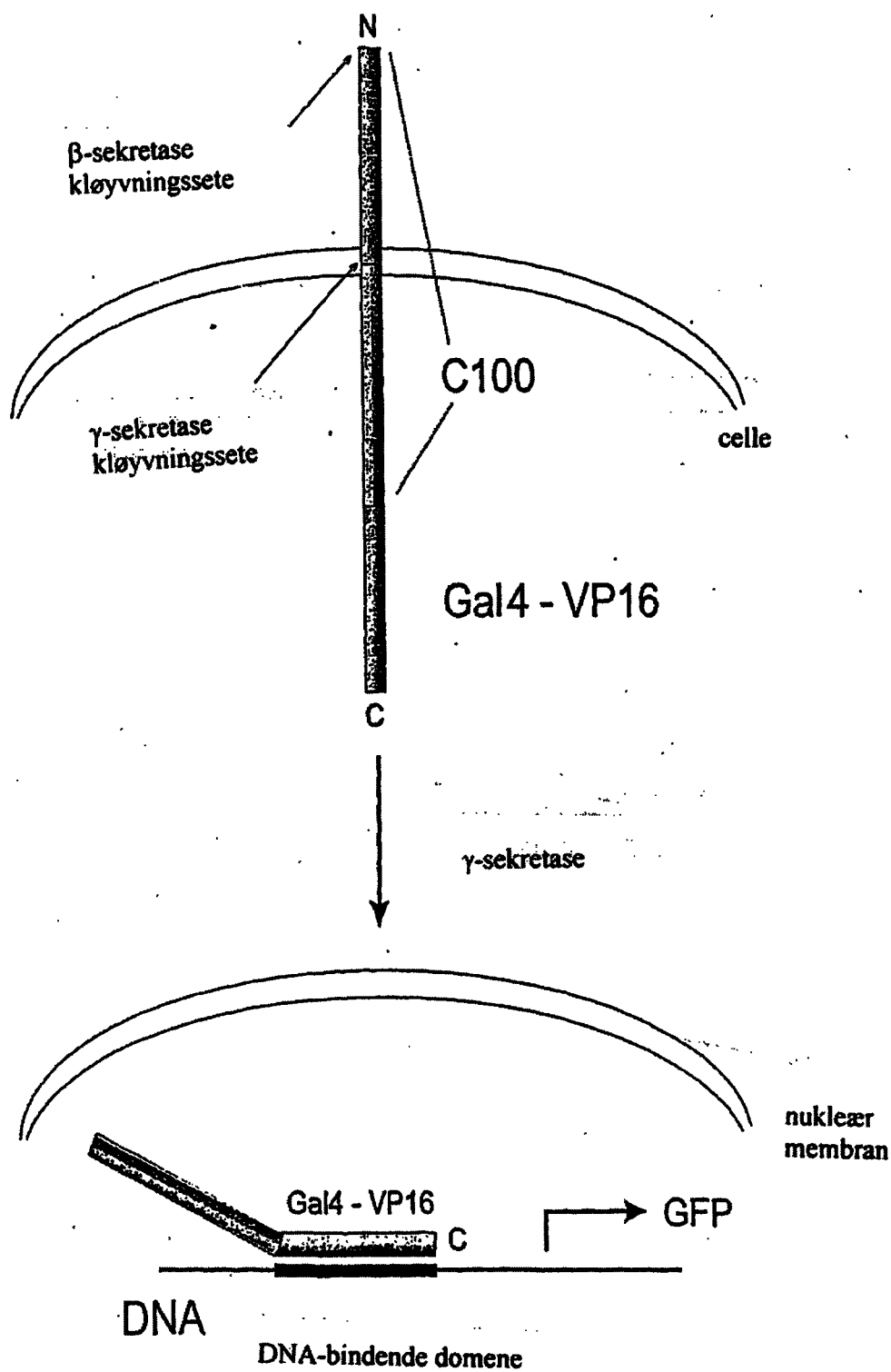


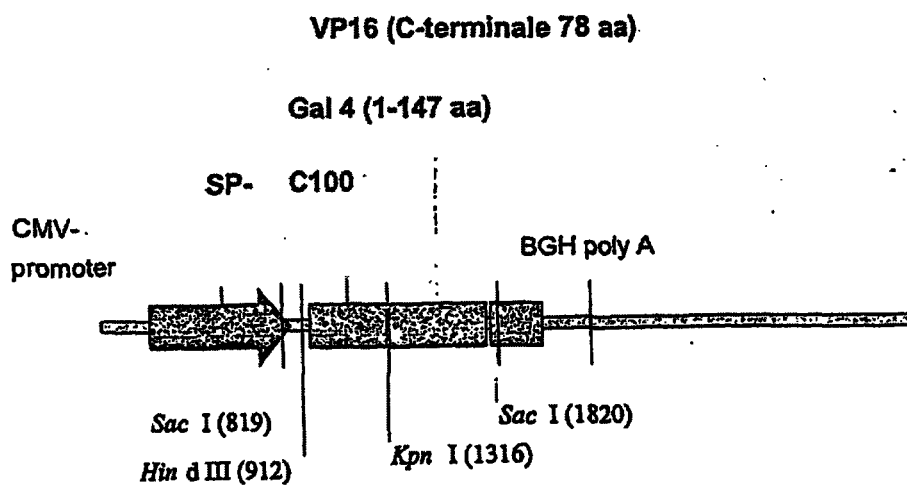
Fig. 2/4:

2/4



3/4

Fig. 3/4:



4/4

Fig. 4/4:

