

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 965201 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **965201**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 15/53

C12N 9/02

C12N 1/15

A61K 7/13

A61K 7/06

D21C 5/00

C12N 15/80

C12R 1:66

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **15.06.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **23.12.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **21.02.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **15.06.1995 PCT/US1995/007536**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

24.06.1994 US 265534

15.05.1995 US 441147

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Novo Nordisk Biotech Inc., 1445 Drew avenue, Davis CA 95616-4880, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Novo Nordisk A/S, Novo Alle, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Yaver, Debbie Sue, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Xu, Feng, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Dalboege, Henrik, Virum, TANSKA, (DK)

4 • Schneider, Palle, Danmark, TANSKA, (DK)

5 • Aaslyng, Dorrit Anita, Danmark, TANSKA, (DK)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Puhdistetut Polyporus-lakkaasit ja niitä koodaavat nukleiinihapot

Renade Polyporus-lackaser och nukleinsyror som kodar dem

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

B-21263 NRRL

B-21267 NRRL

B-21264 NRRL

B-21268 NRRL

B-21265 NRRL

B-21266 NRRL

Puhdistetut Polyporus-lakkaasit, ja niitä koodittavat nukleinihapot - Raffinerade Polyporus-lackaser, och nukleinsyror, som kodar för dem

5

Keksinnön ala

Keksintö koskee eristettyjä nukleinihappofragmentteja, jotka koodittavat sienioksidoreduktaasientsyymiä ja näillä tuotettuja puhdistettuja entsyymejä. Erityisemmin keksintö
 10 koskee nukleinihappofragmentteja, jotka koodittavat basidiomykeetistä, Polyporus'ista olevaa fenolioksidaasia, erityisesti lakkaasia.

Keksinnön tausta

15 Lakkaasit (bentseenidioli:happi-oksidoreduktaasit) ovat usean kuparin sisältäviä entsyymejä, jotka katalysoivat fenolisten yhdisteiden hapetusta. Lakkaasivälitteisistä hapetuksista on tuloksena aryylioksiradikaalivälituotteiden muodostuminen sopivasta fenolisesta substraatista; näin
 20 muodostuneiden välituotteiden viimeisenä tapahtuva liitos aikaansaa yhdistelmän dimeerisistä, oligomeerisistä ja polymeerisistä reaktiotuotteista. Sellaiset reaktiot ovat tärkeitä luonnossa biosynteettisissä reiteissä, jotka johtavat melaniinin, alkaloidien, toksiinien, ligniinien, ja hu-
 25 mushappojen muodostukseen. Lakkaaseja tuottaa laaja valikoima sieniä, mukaan lukien askomykeettejä, kuten Aspergillus, Neurospora ja Podospora, deuteromykeetti Botrytis, ja basidiomykeetit kuten Collybia, Fomes, Lentinus, Pleurotus, Trametes, Polyporus ja Rhizoctonia'n täydelliset muodot.
 30 Lakkaaseilla on laaja substraattispesifisyysjoukko, ja kukin eri sienilakkaasi eroaa muista tavallisesti vain kvantitatiivisesti kyvyltään hapettaa fenolisia substraatteja. Substraattimoninaisuudesta johtuen lakkaaseilla ovat yleisesti löytäneet useita mahdollisia teollisia sovellutuksia.
 35 Näitä ovat mm. ligniinin modifiointi, paperin lujittaminen, värin siirtymisen esto detergenteissä, fenolin polymerointi,

mehunvalmistus, fenolihartsintuotanto, ja jätevedenkäsittely.

Vaikka katalyyttiset kyvyt ovat samanlaisia, eri sienilajien
 5 tuottamalla lakkaaseilla on eri lämpötila- ja pH-optimit, ja
 nämä voivat poiketa myös erityisestä substraatista riippuen.
 Joukko näitä sienilakkaaseja on eristetty, ja geenit useille
 näistä on kloonattu. Esimerkiksi, Choi et al. (Mol. Plant-
 Microbe Interactions 5: 119-128, 1992) kuvaa kastanjan noki-
 10 sienen, *Cryphonectria parasitica*'n lakkaasia koodittavan
 geenin molekyylikarakterisoinnin ja kloonauksen. Kojima et
 al. (J. Biol. Chem. 265: 15224-15230, 1990; JP 2-238885)
 kuvaa valkolahobasidiomykeetti *Coriolus hirsutus*ksen lakkaa-
 sin kaksi alleelistaa muotoa. Germann ja Lerch (Experientia
 15 41: 801, 1985; PNAS USA 81: 8854-8858, 1986) ovat kuvanneet
Neurospora crassa'n lakkaasigeenin kloonauksen ja osittaisen
 sekvensöinnin. Saloheimo et al. (J. Gen. Microbiol. 137:
 1537-1544, 1985; WO 92/01046) on kuvannut *Phlebia radiata*-
 sienestä olevan lakkaasigeenin rakenneanalyysin.

20

Yritykset ekspressoida lakkaasigeenejä heterologissa sieni-
 järjestelmissä antavat usein hyvin alhaiset saannot (Rojima
 et al., yllä; Saloheimo et al., Bio/Technol. 2: 987-990,
 1991). Esimerkiksi *Phlebia radiata*-lakkaasin heterologinen
 25 ekspressointi *Trichoderma reesei*'ssä tuotti vain 20 mg/l
 aktiivista entsyymiä laboratoriomittakaavaisessa fermentoin-
 nissa (Saloheimo, 1991, yllä). Vaikka lakkaaseilla on suuri
 kaupallinen potentiaali, kyky ekspressoida merkittävät mää-
 rät entsyymiä on kriittinen niiden kaupalliselle käyttökeli-
 30 poiselle. Aikaisemmat yritykset basidiomykeettilakkaasien
 ekspressöimiseksi yhdistelmä-DNA-isännissä ovat antaneet
 tulokseksi hyvin alhaiset saannot. Keksintö aikaansaa nyt
 uusia basidiomykeettilakkaaseja, jotka ekspressöityvät hyvin
Aspergillus'issa.

35

Keksinnön yhteenveto

Keksintö koskee DNA-konstruktia, joka sisältää nukleiinihapposekvenssi, joka koodittaa Polyporus-lakkaasia. Keksintö koskee myös nukleiinihapposekvenssin koodittamaa eristettyä
 5 lakkaasia. Edullisesti lakkaasi on oleellisen puhdasta. "Oleellisen puhtaalla" tarkoitetaan lakkaasia, joka on oleellisen (ts. $\geq 90\%$:isesti) vapaata muista ei-lakkaasiproteiineista.

10 Uuden lakkaasin tuotannon helpottamiseksi keksintö aikaansaa myös vektoreita ja isäntäsoluja, jotka käsittävät vaaditun nukleiinihapposekvenssin, jotka vektorit ja isäntäsolut ovat käyttökelpoisia lakkaasin yhdistelmä-DNA-tuotannossa. Sekvenssi on toimintakykyisesti liittynyt transkriptio- ja
 15 translaatiosignaaleihin, jotka pystyvät ohjaamaan lakkaasiproteiinin ekspressiota valitussa isäntäsolussa. Eräs edullinen isäntäsolu on sienisolu, edullisimmin Aspergillus-suvun. Keksinnön mukaisen lakkaasin yhdistelmä-DNA-tuotanto saavutetaan kasvattamalla keksinnön mukaisella konstruktilla
 20 transformoitua tai transfektoitua isäntäsolua tai sen jälkeläistä oloissa, jotka soveltuvat lakkaasiproteiinin ekspressointiin, ja otetaan lakkaasiproteiini talteen viljelmästä.

Keksinnön mukaiset lakkaasit ovat käyttökelpoisia joukossa
 25 teollisia prosesseja, joissa vaaditaan fenolisten yhdisteiden hapetusta. Näitä prosesseja ovat mm. ligniinin käsittely, mehunvalmistus, fenolin polymerointi ja fenolihartsintuotanto.

30 Piirrosten lyhyt kuvaus

Kuviossa 1 esitetään genomikloonin 21GEN DNA-sekvenssi ja translaatio, joka genomikloonin sisältää LCC1:n (SEQ ID NO:1)

Kuviossa 2 esitetään genomikloonin 23GEN DNA-sekvenssi ja
 35 translaatio, joka genomikloonin sisältää LCC2:n (SEQ ID NO:3)

Kuviossa 3 esitetään genomikloonin 24GEN DNA-sekvenssi ja translaatio, joka genomiklooni sisältää LCC3:n (SEQ ID NO:5)

Kuviossa 4 esitetään genomikloonin 31GEN DNA-sekvenssi ja
5 translaatio, joka genomiklooni sisältää LCC4:n (SEQ ID NO:7)

Kuviossa 5 esitetään genomikloonin 41GEN DNA-sekvenssi ja translaatio, joka genomiklooni sisältää LCC5:n (SEQ ID NO:9)

10 Kuviossa 6 esitetään vektorin pMWR1 rakenne.

Kuviossa 7 esitetään vektorin pDSY1 rakenne.

Kuviossa 8 esitetään vektorin pDSY10 rakenne.
15

Kuviossa 9 esitetään pDSY2:lla tuotetun lakkaasin pH-profiili; (A) syringaldatsiinihapetus; (B) ABTS-hapetus.

Kuviossa 10 kuvataan vertailu lakkaasin käytöstä H_2O_2 :een
20 verrattuna, erilaisten väriprekursorien kanssa, hiusten värjäyksessä, DL*:n mittana.

Kuviossa 11 kuvataan vertailu lakkaasin käytöstä H_2O_2 :een
verrattuna, erilaisten väriprekursorien kanssa, hiusten
25 värjäyksessä, Da*:n mittana.

Kuviossa 12 kuvataan vertailu lakkaasin käytöstä H_2O_2 :een
verrattuna, erilaisten väriprekursorien ja modifioijien
kanssa, hiusten värjäyksessä, DL*:n mittana.
30

Kuviossa 13 kuvataan vertailu pesustabiilisuudesta lakkaasilla värjätyillä hiuksilla verrattuna H_2O_2 :lla värjättyihin.

35 Kuviossa 14 kuvataan vertailu valonkestävyydestä lakkaasilla värjätyillä hiuksilla verrattuna H_2O_2 :lla värjättyihin.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Polyporus pinsitus on basidiomykeetti, jota kutsutaan myös Trametes villosa'ksi. Polyporus-laji on aikaisemmin tunnistettu lakkaasintuottajiksi (Fahraeus ja Lindeberg, Physiol. Plant. 6: 150-158, 1953). Aikaisemmin ei kuitenkaan ole kuvattu Polyporus pinsitus'ista olevaa puhdistettua lakkaasia. Nyt on määritetty, että Polyporus pinsitus tuottaa ainakin kahta eri lakkaasia, ja näitä lakkaaseja koodittavia geenejä voidaan käyttää tuottamaan suhteellisen suuret saannot entsyymiä mukavissa isäntäjärjestelmissä kuten Aspergillus. Lisäksi on eristetty myös kolme muuta geenä, jotka vaikuttavat koodittavan lakkaaseja.

Sienikantojen joukon alustavat seulonnat osoittavat, että Polyporus pinsitus on lakkaasintuottaja. Lakkaasin tuotanto P. pinsitus'illa indusoidaan 2,5-ksylidiinillä. Ensin aloitetaan yritykset lakkaasin eristämiseksi indusoitujen kantojen supernatantista. Anioninvaihtokromatografia tunnistaa noin 65-kD (SDS-PAGE:lla) proteiinin, jolla on lakkaasiaktiivisuutta. Entsyymiä puhdistetaan riittävästi aikaansaamaan useita sisäisiä peptidisekvenssejä, samoin kuin N-terminaalisen sekvenssin. Alkusekvenssi-informaatio osoittaa, että lakkaasilla on merkittävää homologiaa Coriolus hirsutus'in lakkaasin kanssa, samoin kuin tunnistamattoman basidiomykeettilakkaasin kanssa (Coil et al., Appl. Environ. Microbiol. 59: 4129-4135, 1993. Sekvenssi-informaation pohjalta suunnitellaan PCR-alukeet, ja suoritetaan PCR cDNA:-lla, joka on eristetty P. pinsitus'ista. PCR:llä saadaan odotetun kokoinen vyöhyke, ja eristetyn fragmentin, joka on liittynyt sellulaasisignaalsekvenssiin, nähdään ekspressiivisen aktiivista lakkaasia A. oryzae'ssa, mutta alhaisilla tasoilla. Yhtä PCR-fragmenteista käytetään myös koettimena P. pinsitus-cDNA-kirjaston seulonnassa. Tällä tavalla tunnistetaan yli 100 positiivista kloonia. Positiiviset kloonit karakterisoidaan, ja sekvensöidään pisimpien kloonien päät; minkään klooneista ei havaita olevan täysimittainen.

Tehdään muita yrityksiä täysimittaisen kloonin eristämiseksi. 5 - 6 kiloemäksen BamHI-kokovalittu P. pinsitus geenikirjasto koetetaan täydellisimmällä cDNA-fragmentilla, joka on eristetty edellä kuvatulla tavalla. Alkuseulonnalla tunnistetaan yksi kloonin 24GEN(LCC3), jolla on homologiaa cDNA:lle, mutta joka ei ole cDNA:n koodittama lakkaasi eikä myöskään täysimittainen. Seuraava 7 - 8 kiloemäksen BamHI/-EcoRI-kokovalitun kirjaston seulonta osoittaa aimakin kahden lakkaasin läsnäolon; osittainen sekvensöinti osoittaa, että toinen, joka on nimeltään 21GEN(LCC1), on identtinen alkupe-
 10 räisen eristetyn osittais-cDNA-kloonin kanssa, ja toinen, joka on nimeltään 31GEN(LCC4), on uusi, aikaisemmin tunnistamaton lakkaasi. EMBL4-geenipankin sekundääriset seulonnat LCC1:lla koettimena tunnistavat klooniluokan, joka sisältää
 15 koko LCC1-insertin samoin kuin 5'- ja 3'-reuna-alueet. EMBL-pankin seulonta LCC3:lla tunnistaa kaksi muuta kloonin, jotka koodittavat lakkaaseja, joita ei ole aikaisemmin tunnistettu, 41GEu(LCC5) ja 23GEN(LCC2), ja jotka poikkeavat rakenteellisesti muista kolmesta kloonista LCC1, LCC3, ja LCC4.
 20 Nukleiinihappo- ja ennustetut aminohapposekvenssit kullekin lakkaaseista esitetään kuvioissa 1 - 5, ja SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROILLA 1 - 10:ssä. Vertailu kunkin lakkaasin rakenteellisesta järjestymisestä esitetään taulukossa 2. Lakkaasit ovat yleensä optimaalisen aktiivisia happamassa pH-ar-
 25 vossa, välillä noin 4 - 5,5.

LCC1:tä käytetään luomaan ekspressiovektoreita, joita puolestaan käytetään transformoimaan erilaisia *Aspergillus*-lajeja. Transformointi on menestyksenkäs kaikissa testatuissa
 30 lajeissa, vaikka ekspressiotasot ovat korkeimmat *Aspergillus niger*'issä. Ravistelupulloviljelmät pystyvät tuottamaan 15 mg/l lakkaasia tai enemmän, ja laboratoriomittakaavaisissa fermenttoreissa havaitaan saantoja yli 300 mg/l. Tämä on merkittävä parannus verrattuna lakkaasitasoihin, jotka on
 35 havaittu aikaisemmin muilla lakkaaseilla ja muilla sienisäntäsoluilla.

Keksinnön mukaisesti voidaan tässä esitettyä tietoa käyttämällä saada lakkaasia koodittava Polyporus-geeni edellä kuvatuilla menetelmillä, tai millä hyvänsä tekniikan tasolla tunnetuilla vaihtoehtoisilla menetelmillä. Geeni voidaan

5 ekspressoida, aktiivisessa muodossa, käyttämällä ekspressiovektoria. Eräs käyttökelpoinen ekspressiovektori sisältää elementin, joka sallii vektorin stabiilin integroinnin isäntäsolugenomiin tai vektorin autonomisen replikaation isäntäsolussa isäntäsolun genomista riippumatta, ja edullisesti

10 yhden tai useita fenotyyppimarkkereita, jotka sallivat transformoitujen isäntäsolujen helpon valinnan. Ekspressiovektori voi myös sisältää kontrollisekvenssit, jotka koodittavat promoottoria, ribosomin kiinnittymiskohtaa, translationaloitussignaalia, ja, mahdollisesti, repressorigeenin

15 tai erilaisia aktivaattorigeenejä. Ekspressoidyn proteiinin erittymisen sallimiseksi voidaan ennen geenin koodisekvenssiä sijoittaa nukleotideja, jotka koodittavat signaalsekvenssiä. Kontrollisekvenssien ohjauksen alaista ekspressiota varten keksinnön mukaisesti käytettävä lakkaasigeeni on

20 toimintakykyisesti liitetty kontrollisekvensseihin oikealle lukualueelle. Promoottorisekvenssejä, jotka voidaan sisällyttää plasmidivektoreihin, ja jotka voivat ohjata lakkaasigeenin transkriptiota, ovat näihin rajoittumatta mm. prokaryoottinen β -laktamaasipromoottori (Villa-Kamaroff, et al.,

25 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731) ja tac-promoottori (DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25). Myös muita viitteitä esitetään artikkelissa "Useful proteins from recombinant bacteria" julkaisussa Scientific American, 1980, 242:74-94; ja käsikirjassa: Sam-

30 brook et al., Molecular Cloning, 1989.

Ekspressiovektori, joka sisältää keksinnön mukaisen DNA-konstruktin, voi olla mikä hyvänsä vektori, joka voidaan sopivasti alistaa yhdistelmä-DNA-menettelytavoille, ja vektorin valinta riippuu tyypillisesti isäntäsolusta, johon se

35 on määrä lisätä. Täten vektori voi olla autonomisesti replikoituva vektori, ts. vektori, joka esiintyy ekstrakromoso-

maalisena kokonaisuutena, jonka replikaatio on kromosomaalisesta replikaatiosta riippumatonta, esimerkiksi plasmidi, tai ekstrakromosomaalinen elementti, minikromosomi tai keinotekoinen kromosomi. Vaihtoehtoisesti, vektori voi olla
 5 sellainen, joka isäntäsoluun lisättäessä integroituu isäntäsolugenomiin, ja replikoituu yhdessä kromosomi(e)n kanssa, jo(ho/ihi)n se on integroitunut.

Lakkaasi-DNA-sekvenssin olisi oltava vektorissa toimintakykyisesti liittyneenä sopivaan promoottorisekvenssi. Promoottori voi olla mikä hyvänsä DNA-sekvenssi, jolla on transkriptioaktiivisuutta valitussa isäntäsolussa, ja se voi olla peräisin geeneistä, jotka koodittavat proteiineja, jotka
 10 ovat joko homologisia tai heterologisia isäntäsolulle. Esimerkkejä sopivista promoottoreista keksinnön mukaisen DNA-konstruktin transkription ohjaamiseksi, erityisesti bakteeri-isännässä, ovat *E. coli*'n lac-operonin promoottori, *Streptomyces coelicolor*'in agaraasigeenin dagA-promoottorit, *Bacillus licheniformis*'in α -amylaasigeenin (amyL) promoottorit,
 15 *Bacillus stearothermophilus*'in maltogeenisen amylaasigeenin (amyN) promoottorit, *Bacillus amyloliquefaciens*'in α -amylaasin (amyQ) promoottorit, tai *Bacillus subtilis*'in xylA- ja xylB-geenien promoottorit. Hiivaisännässä eräs käyttökelpoinen promoottori on eno-1-promoottori. Sieni-
 25 isännässä transkriptiota varten, esimerkkejä käyttökelpoisista promoottoreista ovat sellaiset, jotka ovat peräisin geenistä, joka koodittaa *A. oryzae*'n TAKA-amylaasia, *Rhizomucor miehei*'n asparagiihihappoproteinaasia, *A. niger*'in neutraalia α -amylaasia, *A. niger*'in happostabiilia α -amylaasia,
 30 *A. niger*'in tai *A. awamori*'n glukoaamylaasia (glaA), *Rhizomucor miehei*'n lipaasia, *A. oryzae*'n alkalista proteaasia, *A. oryzae*'n trioosifosfaatti-isomeraasia tai *A. nidulans*'in asetamidaasia. Edullisia ovat the TAKA-amylaasi- ja glaA-promoottorit.

35

Keksinnön mukainen ekspressiovektori voi myös käsittää sopivan transkription terminaattorin ja, eukaryooteissa, poly-

- adenylointisekvenssit liittyneenä toimintakykyisesti DNA-sekvenssiin, joka koodittaa keksinnön mukaista lakkaasia. Terminaatio- ja polyadenylointisekvenssit voivat sopivasti olla peräisin samasta lähteestä kuin promoottori. Edelleen
- 5 vektori voi käsittää DNA-sekvenssin, joka mahdollistaa vektorin replikoitumisen kyseessä olevassa isäntäsolussa. Esimerkkejä sellaisista sekvensseistä ovat plasmidien pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 ja pIJ702 replikaation alut.
- 10 Vektori voi myös käsittää valittavissa olevan markkerin, esimerkiksi geenin, jonka tuote täydentää isäntäsolussa olevaa vikaa, kuten dal-geenit *B. subtilis*'ista tai *B. licheniformis*'ista, tai sellaisen, joka antaa antibioottiresistanssin, kuten ampisilliini-, kanamysiini-, kloramfenikoli- tai tetrasykliiniresistenssin. Esimerkkejä *Aspergillus*-
- 15 valintamarkkereista ovat mm. *amdS*, *pyrG*, *argB*, *niaD*, *sC*, *trpC* ja *hygB*, markkeri, joka aiheuttaa hygromysiiniresistenssiä. Edullisia *Aspergillus*-isäntäsolussa käyttöön ovat *A. nidulans*'in tai *A. oryzae*'n *amdS*- ja *pyrG*-markkerit. Eräs
- 20 usein käytetty nisäkäsmarkkeri on dihydrofolaatireduktaasi (DHFR)-geeni. Lisäksi valinta voidaan suorittaa kotransformaatiolla, esimerkiksi julkaisussa WO 91/17243 kuvatulla tavalla.
- 25 On yleensä edullista, että ekspressio aiheuttaa tuotteen, joka on ekstrasellulaarista. Täten keksinnön mukaiset lakkaasit käsittävät esialueen, joka sallii ekspressoituvan proteiinin erittymisen kasvatusväliaineeseen. Haluttaessa tämä esialue voi olla keksinnön mukaiselle lakkaasille luontainen,
- 30 tai se voi olla substituoitu eri esialue- tai signaalsekvenssillä, suorittaen sopivasti korvaamalla DNA-sekvenssit, jotka koodittavat vastaavia esialueita. Esimerkiksi, esialue voi olla peräisin glukomylaasi- tai amylaasigeenistä *Aspergillus*-lajista, amylaasigeeni *Bacillus*-lajista,
- 35 ta, lipaasi- tai proteinaasigeeni *Rhizomucor miehei*'stä, *Saccharomyces cerevisiae*'n α -faktorin geenistä tai vasikan preprokymosiinigeenistä. Erityisen edullinen, kun isäntä on

sienisolu, on *A. oryzae*'n TAKA-amylaasin, *A. niger*'in neutraalin amylaasin signaalisekvenssi, *Rhizomucor miehei*'n asparagiinihappoproteinaasisignaali, *Rhizomucor miehei*'n lipaasisignaali, maltogeeninen amylaasi *Bacillus* NCIB 11837:stä, *B. stearothermophilus*'in α -amylaasista, tai *B. licheniformis*'in subtilisiini.

Menettelytavat, joita käytetään keksinnön mukaisen DNA-konstruktin, promoottorin, terminaattorin ja muiden elementtien liittämiseen, vastaavasti, ja niiden insertoimiseksi sopiviin vektoreihin, jotka sisältävät replikaatioon välttämättömän informaation, ovat ammattimiesten hyvin tuntemia (katso esimerkiksi käsikirjaa: Sambrook et al., *Molecular Cloning*, 1989).

Keksinnön mukaista solua, joka käsittää joko edellä määritellyn DNA-konstruktin tai ekspressiovektorin, käytetään edullisesti isäntäsoluna keksinnön mukaisen entsyymin yhdistelmä-DNA-tuotannossa. Solu voidaan transformoida keksinnön mukaisella DNA-konstruktilla, mukavasti integroimalla DNA-konstruktin isäntäkromosomiin. Tätä integroitumista pidetään yleensä etuna, koska DNA-sekvenssi todennäköisemmin pysyy stabiilisti solussa. DNA-konstruktien integrointi isäntäkromosomiin voidaan suorittaa tavanomaisilla menetelmillä, esimerkiksi homologisella tai heterologisella rekombinaatiolla. Vaihtoehtoisesti solu voidaan transformoida edellä eri isäntäsolutyyppeiden yhteydessä kuvatulla ekspressiovektorilla.

Isäntäsolu voi olla prokaryoottisia soluja, kuten bakteerisoluja. Esimerkkejä sopivista bakteereista ovat gram-positiiviset bakteerit kuten *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, tai *Streptomyces lividans* tai *Streptomyces murinus*, tai gram-negatiivisia bakteereja, kuten *E. coli*. Bakteerien transfor-

mointi voidaan suorittaa esimerkiksi protoplastitransformoinnilla, tai käyttämällä kompetentteja soluja sinänsä tunnetulla tavalla.

- 5 Isäntäsolu voi myös olla eukaryootti, kuten nisäkässolut, hyönteissolut, kasvisolut tai edullisesti sienisolut, mukaan lukien hiivat ja filamenttisienet. Käyttökelpoisia nisäkäs-
soluja ovat esimerkiksi CHO- tai COS-solut. Hiivaisäntäsolu
10 voi olla *Saccharomyces*- tai *Schizosaccharomyces*-laji, esimerkiksi *Saccharomyces cerevisiae*. Käyttökelpoiset filament-
tisienet voivat olla *Aspergillus*-lajeija, esimerkiksi *Asper-*
gillus *oryzae* tai *Aspergillus niger*. Vaihtoehtoisesti isän-
täsoluna voidaan käyttää *Fusarium*-lajin kantaa, esimerkiksi
15 *F. oxysporum*'ia. Sienisolut voidaan transformoida menetel-
mällä, johon liittyy protoplastin muodostus ja protoplastien
transformointi, sen jälkeen soluseinämän uudelleen muodosta-
minen sinänsä tunnetulla tavalla. Eräs sopiva menettelytapa
Aspergillus-isäntäsolujen transformoimiseksi kuvataan jul-
kaisussa EP 238 023. Eräs sopiva menetelmä *Fusarium*-lajien
20 transformoimiseksi kuvataan julkaisussa Malardier et al.,
1989.

Täten keksintö aikaansaa menetelmän keksinnön mukaisen yhdistelmä-DNA-lakkaasin tuottamiseksi, jossa menetelmässä
25 kasvatetaan edellä kuvattua isäntäsolua oloissa, jotka joh-
tavat entsyymien muodostumiseen, ja otetaan entsyymi talteen
soluista ja/tai kasvatusväliaineesta. Solujen kasvatukseen
käytetty väliaine voi olla mitä hyvänsä tavanomaista väli-
ainetta, joka soveltuu lyseessä olevan isäntäsolun kasvatuk-
30 seen ja keksinnön mukaisen lakkaasin ekspression saavuttami-
seen. Sopivia väliaineita on saatavissa kaupallisilta toi-
mittajilta, tai niitä voidaan valmistaa julkaistujen reseptien
mukaan (esimerkiksi laitoksen the American Type Culture
Collection luetteloissa).

35

Eräässä edullisessa suoritustavassa lakkaasin yhdistelmä-DNA-tuotanto viljelmässä saavutetaan kuparin ylimäärän läsnä

ollessa. Vaikka kasvatusväliaineeseen lisätyt hivenmetallit sisältävät tyypillisesti pienen määrän kuparia, keksinnön yhteydessä suoritettut kokeet osoittavat, että kuparitäydennyksen lisääminen väliaineeseen voi lisätä aktiivisen entsyymin saantoa moninkertaisesti. Edullisesti kupari lisätään väliaineeseen liukoisessa muodossa, edullisesti liukoisen kuparисуolan, kuten kuparikloridin, kuparisulfaatin tai kupariasetaatin muodossa. Kuparin lopullisen konsentraation väliaineesssa pitäisi olla alueella 0,2 - 2 mM, ja edullisesti alueella 0,05 - 0,5 mM. Tätä menetelmää voidaan käyttää minkä hyvänsä yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotetun sienilakkaasin, samoin kuin muiden kuparia sisältävien entsyymien, erityisesti oksidoreduktaasien saannon lisäämiseen.

Tulokseksi saatu entsyymi voidaan ottaa talteen väliaineesta tavanomaisilla menettelytavoilla, mukaan lukien erottamalla solut väliaineesta sentrifugoimalla tai suodattamalla, saostamalla supernatantin tai suodoksen proteiinikomponentit, esimerkiksi ammoniumsulfaatin avulla, sen jälkeen puhdistamalla erilaisilla kromatografisilla menettelytavoilla, esimerkiksi ioninvaihtokromatografiolla, geelisuodatuskromatografiolla, affiniteettikromatografiolla, tai vastaavilla tavoilla. Edullisesti eristetty proteiini noin 90-%:isen puhdasta määritettynä SDS-PAGE:lla, puhtaiden ollessa tärkeintä elintarvike-, mehu- tai detergenttisovellutuksissa.

Eräässä erityisen edullisessa suoritusmuodossa lakkaasin ekspressio saavutetaan sieni-isäntäsolussa, kuten *Aspergillus*'issa. Kuten seuraavissa esimerkeissä kuvataan yksityiskohtaisesti, lakkaasigeeni liitetään plasmidiin, joka sisältää *Aspergillus oryzae*'n TAKA- α -amylaasipromoottorin, ja *Aspergillus nidulans*'in amdS-valittavissa olevan markkerin. Vaihtoehtoisesti amdS voi olla erillisessä plasmidissa, ja sitä käytetään kotransformointiin. Plasmidia (tai plasmeja) käytetään transformoimaan *Aspergillus*-lajin isäntäsolun, kuten *A. oryzae*'n tai *A. niger*'in menetelmillä, jotka on kuvannut Yelton et al. (PNAS USA 81: 1470-1474, 1984).

Erityisesti on mainittava, että Polyporus-lakkaasin saannot keksinnössä Aspergillus'ia isäntäsoluna käytettäessä ovat odottamattomasti ja merkittävästi korkeammat kuin aikaisemmin on kuvattu muiden lakkaasien ekspressiolle muissa isäntäsoluissa. Odotetaan, että Aspergillus'in käyttö isäntäsoluna lakkaasien tuotannossa muista basidiomykeeteistä, kuten Coriolus'ista tai Trametes'ista, tuottaa myös suuremmat entsyymimäärät kuin aikaisemmin on ollut saatavissa. Sen vuoksi keksintö käsittää myös sellaisten Polyporus-tyyppisten lakkaasien tuotannon yhdistelmä-DNA-Aspergillus-isäntäsoluissa.

Ammattimiehet ymmärtävät, että keksintö ei rajoitu erityisesti tässä, esimerkiksi kuvioissa 1 - 5 kuvattujen nukleiinihappofragmenttien käyttöön. On myös selvää, että keksintö käsittää ne nukleotidisekvenssit, jotka koodittavat samoja aminohapposekvenssejä kuin kuviossa 1 - 5 kuvatut, mutta jotka eroavat erityisesti kuvatuista nukleotidisekvensseistä geneettisen koodin degeneraation puolesta. Myös, selityksessä ja patenttivaatimuksissa olevan viittauksen kuvioihin 1 - 5 ymmärretään käsittävän sekä tässä kuvatun geenisekvenssin että vastaavat cDNA- ja RNA-sekvenssit, ja käsitteiden "DNA-konstrukti" ja "nukleiinihapposekvenssit" tässä käytettäessä ymmärretään käsittävän kaikki sellaiset muunnelmat. "DNA-konstruktin" ymmärretään yleisesti tarkoittavan DNA-molekyyliä, joko yksi- tai kaksijousteista, joka voidaan eristää osittaisessa muodossa luonnollisesti esiintyvistä geenistä tai jota on modifioitu sisältämään DNA-segmenttejä, jotka on yhdistetty ja asetettu rinnan tavalla, jota ei muuten esiintyisi luonnossa.

Lisäksi keksintö käsittää myös muita Polyporus-lakkaaseja, mukaan lukien lakkaasin vaihtoehtoisia muotoja, joita voi esiintyä Polyporus pinsitus'issa, ja samoin kuin lakkaaseja, joita voi esiintyä muissa sienissä, jotka kuuluvat Polyporus'in määritelmään, jonka on esittänyt Fries, tai niiden synonyymejä, kuten kuvataan teoksessa: Long et al., 1994,

ATCC Names of Industrial Fungi, ATCC, Rockville, Maryland. Lakkaasigeenien tunnistus ja eristys muista kuin erityisesti tässä esimerkkinä esitetyistä lähteistä voidaan saavuttaa käyttämällä keksinnön esimerkeissä kuvattua metodologiaa

5 käyttämällä, julkisesti saatavilla Polyporus-kannoilla. Vaihtoehtoisesti tässä kuvattua sekvenssiä voidaan käyttää suunnittelemaan alukkeita ja/tai koettimia, jotka ovat käyttökelpoisia lakkaasigeenien eristyksessä standardi-PCR- tai "Southern"-hybridisointitekniikoilla. Muita nimettyjä Polyporus-lajeja ovat, mutta näihin rajoittumatta, mm. *P. zonatus*, *P. alveolaris*, *P. arcularius*, *P. australiensis*, *P. badius*, *P. biformis*, *P. brumalis*, *P. ciliatus*, *P. colensoi*, *P. eucalyptorum*, *P. meridionalis*, *P. varius*, *P. palustris*, *P. rhizophilus*, *P. rugulosus*, *P. squamosus*, *P. tuberaster* ja

10 *P. tumulosus*. Otetaan huomioon myös lakkaasit, jotka ovat synonyymejä, esimerkiksi anamorfeja tai täydellisiä tiloja Polyporus-suvun lajeista tai kannoista. Polyporus-kantoja on helposti yleisön saatavissa joukosta viljelmäkoelmia, kuten the American Type Culture Collection (ATCC), esimerkiksi, ATCC 26721, 9385, 11088, 22084, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), esimerkiksi, DSM 1021, 1023, ja 1182; ja Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), esimerkiksi, CBS 678.70, 166.29, 101.15, 276.31, 307.39, 334.49, ja 332.49. Keksintö käsittää myös

25 minkä hyvänsä varianttinukleotidisekvenssin, ja sen koodittaman proteiinin, jolla proteiinilla on ainakin noin 80-%:inen homologia, edullisesti ainakin noin 85-%:inen, ja edullisimmin ainakin noin 90- - 95-%:inen homologia minkä hyvänsä kuvioissa 2 - 5 kuvatuista aminohapposekvensseistä

30 kanssa, ja jolla on säilynyt kvalitatiivisesti tässä kuvatussa sekvenssin lakkaasiaktiivisuus. Käyttökelpoisia variantteja edellä määritettyjen luokkien puitteissa ovat, esimerkiksi, sellaiset, joihin on tehty konservatiivisia aminohapposubstituutioita, jotka eivät merkittävästi vaikuta proteiinin

35 aktiivisuuteen. Konservatiivisella substituutiolla tarkoitetaan, että saman luokan aminohapot voidaan korvata millä hyvänsä tuona luokan aminohapolla. Esimerkiksi ei-polaariset

alifaattiset tähteet Ala, Val, Leu ja Ile voidaan vaihtaa keskenään, samoin kuin emäksiset tähteet Lys ja Arg, tai happamat tähteet Asp ja Glu. Samalla lailla Ser ja Thr ovat toistensa konservatiivisia substituutioita, samoin kuin Asn ja Gln. Ammattimiehelle on selvää, että sellaisia substituutioita voidaan tehdä molekyylin toiminnalle kriittisten alueiden ulkopuolelle ja yhä saada tulokseksi aktiivisen entsyymin. Halutun aktiivisuuden säilyminen voidaan määrittää helposti suorittamalla standardi-ABTS-hapetusmenetelmän, kuten keksinnön esimerkeissä kuvataan.

Proteiinia voidaan käyttää luokossa erilaisia teollisia prosesseja. Näitä prosesseja ovat mm. ligniinin, sekä kraft- että ligninisulfaattien polymerointi, liuoksessa, jotta saataisiin ligniiniä, jolla on suurempi molekyyli massa. Sellaisia menetelmiä kuvataan esimerkiksi julkaisussa: Jin et al. *Holzforschung* 45(6): 467-468, 1991; US-patenttijulkaisussa 4,432,921; julkaisuissa EP 0 275 544; PCT/DR93/00217, 1992.

Keksinnön mukaista lakkaasia voidaan myös käyttää kraftmassassa olevan ligniinin in-situ-depolymerointiin, tuottaen täten massaa, jolla on alhaisempi ligniinipitoisuus. Tämä lakkaasin käyttö on parannus nykyiseen kloorin käyttöön ligniinin depolymeroimiseksi, joka johtaa kloorattujen aromaattisten yhdisteiden muodostumiseen, jotka ovat paperitehtaiden ympäristöllisesti ei-toivottavaa sivutuotetta. Sellaisia käyttöjä kuvataan esimerkiksi julkaisuissa: *Current opinion in Biotechnology* 3: 261-266, 1992; *J. Biotechnol.* 25: 333-339 1992; Hiroi et al., *Svensk papperstidning* 5: 162-166, 1976.

Värien tai väriprekursorien ja muiden kromoforiyhdisteiden hapetus johtaa yhdisteiden värinmenetykseen. Lakkaasia voidaan käyttää tähän tarkoitukseen, joka voi olla erityisen edullinen tilanteessa, jossa värin siirtyminen kankaiden välillä on ei-toivottavaa, esimerkiksi tekstiiliteollisu-

nessa ja väriteollisuudessa. Menetelmät värin siirtymisen estämiseksi ja värin hapettamiseksi esitetään julkaisuissa: WO 92/01406; WO 92/18683; EP 0495836; ja Calvo, Mededelingen van de Faculteit Landbouw-wetenschappen/Rijksuniversiteit
 5 Gent. 56: 1565-1567, 1991; Tsujino et al., J. Soc. Chem. 42: 273-282, 1991.

Lakkaasi on erityisen hyvin sopivaa hiusten värjäyksessä käyttöön. Sellaisessa käytössä lakkaasi saatetaan kontaktiin
 10 väriprekursorin kanssa, edullisesti hiuksilla, jolloin saavutetaan kontrolloitu väriprekursorin hapetus prekursorin muuttamiseksi väriksi, tai pigmenttiä tuottavaksi yhdisteeksi, kuten kinoidiyhdisteeksi. Väriprekursori on edullisesti aromaattista yhdistettä, joka kuuluu yhteen kolmesta tärkeimmästä kemiallisesta perheestä: diamiinit, aminofenolit
 15 (tai aminonaftolit) ja fenolit. Väriprekursoreita voidaan käyttää yksinään tai yhdistelmänä. Ainakin yhden välituotteen kopolymeroinnissa on oltava orto- tai para-diamiinia tai aminofenolia (primääristä välituotetta). Esimerkkejä
 20 sellaisista esitetään luvussa V, alla, ja kuvataan myös US-patenttijulkaisussa 3,251,742, jonka sisältö liitetään tähän viitteeksi. Yhdessä suoritusmuodossa lähtömateriaalit sisältävät paitsi entsyymiä ja primääristä välituotetta, vaan modifioijaa (yhdistintä) (tai modifioijien yhdistelmää),
 25 joka modifioija on tyypillisesti meta-diamiinia, meta-aminofenolia tai polyfenolia. Sitten modifioija reagoi primäärisen välituotteen kanssa lakkaasin läsnä ollessa, muuttaen sen värilliseksi yhdisteeksi. Eräässä toisessa suoritusmuodossa lakkaasia voidaan käyttää primäärisen välituotteen
 30 kanssa suoraan, hapettamaan sen värilliseksi yhdisteeksi. Kaikissa tapauksissa värjäysprosessi voidaan suorittaa yhden tai usean primäärisen välituotteen kanssa, joko yksinään tai yhdistelmänä yhden tai usean modifioijan kanssa. Komponenttien määrät ovat vastaavien komponenttien tavallisten kaupallisten määrien mukaisia, ja komponenttien osuudet voivat vaihdella sen mukaisesti.

Tämän lakkaasin käyttö on parannus perinteisempään H_2O_2 :n käyttöön verrattuna, siinä, että viimeksi mainittu voi vaurioittaa hiuksia, ja tavallisesti sen käyttö vaatii korkeaa pH-arvoa, joka myös vahingoittaa hiuksia. Vastakohtana reaktio lakkaasin kanssa voidaan suorittaa alkalisessa, neutraalissa tai jopa happamassa pH-arvossa, ja hapetukseen tarvittava happi tulee ilmasta, ankaran kemiallisen hapetuksen sijasta. Polyporus-lakkaasia käyttämällä saavutettavissa oleva tulos on verrattavissa H_2O_2 :ta käyttämällä saavutettavaan, ei ainoastaan värinmuodostuksessa, vaan myös pesunkestävyydessä ja valonkestävyydessä. Eräs kaupallinen lisäetu on, että voidaan tehdä yksi ainoa säiliöpakkaus, joka sisältää sekä lakkaasin ja prekursorin, hapettomassa ilmakehässä, mikä järjestely ei ole mahdollista H_2O_2 :ta käyttäen.

Keksinnön mukaista lakkaasia voidaan myös käyttää polymeroimaan fenolisia - tai aniliiniyhdisteitä, joita on läsnä nesteissä. Eräs esimerkki sellaisesta käytöstä on mehujen, kuten omenamehun käsittely, niin että lakkaasi kiihdyttää me-
 20 hussa läsnä olevien fenolisten yhdisteiden saostumista, tuottaen täten stabiilimpaa mehua. Sellaisia sovellutuksia on kuvattu julkaisuissa: Stutz, Fruit processing 7/93, 248-252, 1993; Maier et al., Dt. Lebensmittelrindschau 86(5): 137-142, 1990; Dietrich et al., Fluss. Obst 57(2): 67-73,
 25 1990.

Lakkaasit kuten Polyporus-lakkaasi ovat käyttökelpoisia myös maaperän myrkyttömäksiteossa (Nannipieri et al., J. Environ. Qual. 20: 510-517, 1991; Dec ja Bollag, Arch. Environ. Con-
 30 tam. Toxicol. 12: 543-550, 1990).

Keksintöä kuvataan edelleen seuraavilla ei-rajoittavilla esimerkeillä.

35 Esimerkit

I. Polyporus pinisitus-lakkaasientsyymin eristys
 Materiaalit ja menetelmät

1. Entsymaattiset määritykset

Ellei muuta mainita, lakkaasiaktiivisuus määritetään kautta esimerkkien syringaldatsiinilla ja 2,2'-bisatsino(3-etyyli-bentstiatsoliini-6-sulfonihapolla) (ABTS), seuraavasti.

- 5 Syringaldatsiinin hapetusta tarkkaillaan aallonpituudella 530 nm 19 μ M substraatilla. Seoksessa, jossa on 25 mM natriumasetaattia, 40 μ M kupari(II)sulfaattia, pH 5,5, 30 °C:ssa, aktiivisuus ilmaistaan yksikössä LACU (μ mol/min). pH-profiilitutkimuksia varten käytetään Britton & Robin-
10 son(B&R)-puskureita, ja valmistetaan protokollan mukaan, joka kuvataan käsikirjassa: Quelle, Biochemisches Taschenbuch, H.M. Raven, II. osa, s. 93 ja 102, 1964. ABTS-hapetus suoritetaan 1 mM ABTS:llä 0,1 M NaAc:ssä, pH 5,0, huoneen-
lämpötilassa tarkkailemalla joko Δ Abs₄₀₅-arvoa 96-kaivoisella
15 levyllä(Costar) tai Δ Abs₄₁₈-arvoa kvartsikyvetissä. Päällyskerroksen ABTS-oksidaasiaktiivisuusmääritys suoritetaan kaatamalla jäähdytettyä ABTS-agaroosia (0,03 - 0,1 g ABTS:ää, 1 g agaroosia, 50 ml H₂O:ta, kuumennettu agaroosin liuottamiseksi) natiivin IEF-geelin tai PAGE:n päälle ja inkuboimalla
20 huoneenlämpötilassa.

2. Lakkaasin alustava eristys

- Lakkaasin eristämiseksi 800 ml kasvatusnestettä suodatetaan HFSC:llä Supra-suodattimella (hidas suodatus). Sitten kirkas
25 suodos konsentroidaan ja pestään Amicon-solulla GR81 PP-membraanilla tilavuuteen 72 ml.

- 1-ml:iset erät lakkaasia sidotaan Q-sepharose HP (Pharmacia, Ruotsi) -kolonniin, joka on tasapainotettu 0,1 M fosfaatilla, pH 7, ja lakkaasi eluoidaan NaCl-gradientilla. Kaikkiaan
30 puhdistetaan 10 x 1-ml:isia näytteitä, yhdistetään, konsentroidaan, ja pestään ultrasuodatuksella käyttämällä membraania, jonka molekyylimassaraja on 6 kD.

35 3. Sekundäärinen puhdistus

Toisessa puhdistuksessa fermentointiliemi suodatetaan ja konsentroidaan ultrasuodatuksella. Lähtöainemateriaali si-

sältää 187 LACU/ml. Tiiviste pikasuodatetaan Propex 23-suodattimella (P & S Filtration), 3-%:isella Hyflo Cuper-Cel'-illä (HSC; Celite Corporation), minkä jälkeen seuraa kaksi ultrasuodatusta Filtron-suodattimella, jossa on kaksi membraania, joista kummankin molekyylimassaraja on 3 kD. Tulokseksi saatu näyte (2,5 mS/cm, pH 7,0, 4 °C:ssa) lisätään 130-ml:iseen Q-Sepharose-kolonnein, joka on tasapainotettu natriumfosfaatilla, 1,1 mS/cm, pH 7,0. Näissä oloissa lakkaasi ei sitoudu kolonnein, vaan eluoituu hitaasti kolonnista lisäyksen ja tasapainotuspuskurilla pesun aikana, jolloin saadaan tulokseksi osittainen erottuminen muuten ruskehtavasta materiaalista.

Tämä osaksi puhdistettu valmiste, jossa on 1,0 mS, pH 7,0 20 °C:ssa, lisätään Q-sepharose-kolonnein. Kolonni tasapainotetaan 20 mM natriumfosfaatilla, 2,2 mS, pH 7,0. Näissä oloissa lakkaasi sitoutuu kolonnein ja eluoituu gradientilla, jossa on 0 - 1 M NaCl:ää 20 kolonnitilavuuden aikana.

20 3. Sekvensöinti

Sisäistä peptidisekvensöintiä varten puhdistettu proteiini sulatetaan trypsiinillä, minkä jälkeen seuraa peptidipuhdistus HPLC:llä. Puhdistetut peptidit sekvensöidään Applied Biosystems 473A-sekvensöintilaitteella.

25

B. Tulokset ja pohdinta

1. Alustava karakterisointi

Alustavan puhdistuksen kokonaissaanto on noin 50 mg (arvioituna A280nm:llä). Puhdistettu entsyymi on väriltään runsaansinistä, ja esiintyy SDS-PAGE:lla vain kahtena hyvin lähekkäin olevana vyöhykkeenä johdalla noin 65 kd. Natiivilla PAGE:lla, joka on päällystetty substraatilla, nähdään, että molemmilla vyöhykkeillä on lakkaasiaktiivisuutta ABTS:n kanssa. Absorptiospektristä nähdään, että absorption A280nm lisäksi puhdistetulla lakkaasilla on absorptiota myös noin 600 nm:llä.

2. Sekvensöinti

Alun perin puhdistetun proteiinin N-terminaalisisällä määrityksellä nähdään yksi ainoa sekvenssi:

5 Gly-Ile-Gly-Pro-Val-Ala-Asp-Leu-Thr-Ile-Thr-Asn-Ala-Ala-Ala-Val-Ser-Pro-Asp-Gly-Phe-Pro...

Koska N-terminaalinen sekvenssi ei ole ihanteellinen sekvenssi koettimen konstruointiin, suoritetaan lisäkokeita trypsiinisulatuksella, minkä jälkeen puhdistetaan edelleen (edellä kuvatulla tavalla) ja sekvensöidään fragmentit.

2. Sekundäärinen puhdistus ja karakterisointi

Toisessa puhdistuksessa toinen Q-Sepharose-kromatografiavaihe tuottaa seuraavat poolit:

Q-Sepharose-2-pooli-1 40 ml 112 LACU 47 LACU/A₂₈₀

Q-Sepharose-2-pooli-3 80 ml 385 LACU 65 LACU/A₂₈₀

20 Eluointi antaa saannoksi >80 % lisätystä määrästä. Hyvin puhdistetulla valmisteella Q-Sepharose-2-pooli-3 on A₂₈₀ = 5,9, ja A₂₈₀/A₂₆₀ = 1,4. Lähtöaineessa olevan lakkaasin puhdistus on äärimmäisen korkea proteiinipohjalta, mutta lähtöaine on väriltään hyvin tummanruskeaa. SDS-PAGE:lla nähdään
25 kaksoisvyöhyke, jossaa on vallitseva 65-kD vyöhyke ja pienempi 62-kD vyöhyke. Anionisella kromatografialla vain vallitseva vyöhyke nähdään ensimmäisessä huipussa (Q-Sepharose-2-pooli-1), kun taas molemmat vyöhykkeet nähdään toisessa huipussa (Q-Sepharose-2-pooli-3).

30

3. Sekvenssi

Määritetään joukko sisäisiä peptidisekvenssejä, ja verrataan *Coriolus hirsutus* (Ch)-lakkaasisekvenssin kanssa. Tunnistettut fragmentit ovat seuraavat:

35 Tryp 13:

Ser-Pro-Ser-Thr-Thr-Thr-Ala-Ala-Asp-Leu

Tryp 14:

Ser-Ala-Gly-Ser-Thr-Val-Tyr-Asn-Tyr-Asp-Asn-Pro-Ile-Phe-Arg
 Tryp 16:

Sekvenssi 1:

Ser-Thr-Ser-Ile-His-Trp-His-Gly-Phe-Phe-Gln-Lys

5 Sekvenssi 2:

Gly-Ile-Gly-Pro-Val-Ala-Asp-Leu-Thr-Ile-Thr-Asn-Ala-Ala-Val

Tryp 18:

Gly-Ile-Gly-Pro-Val-Ala-Asp-Leu-Thr-Ile-Thr-Asn

Tryp 19:

10 Sekvenssi 1:

Leu-Gly-Pro-Ala-Phe-Pro-Leu-Gly-Ala-Asp-Ala-Thr-Leu-Ile

Sekvenssi 2:

Phe-Gln-Leu-Asn-Val-Ile-Asp-Asn-Asn-Thr-Thr-His-Thr-Met

Tryp 25:

15 Tyr-Ser-Phe-Val-Leu-Glu-Ala-Asn-Gln-Ala-Val-Asp-Asn-Tyr-Trp-Ile-Arg

Tryp 27

Gly-Thr-Asn-Trp-Ala-Asp-Gly-Pro-Ala-Phe

20 II. Polyporus pinisitus'in lakkaasi-cDNA-kloonin eristys

A. Materiaalit ja menetelmät

1. RNA:n valmistus

RNA eristetään 10 g:sta P. pinsitus-myseeliä, jota kasvate-

25 guanidium/CsCl-patjamenetelmää. RNA poly-A-valitaan oligo-dT-kolonnilla, käyttämällä standardiolosuhteita. Saadaan 120 µg mRNA:ta, ja varastoidaan lyofilisoituna pellettinä 5-µg:isissa erissä -80 °C:ssa.

30 2. Yksijuosteinen cDNA

Yksijuosteinen cDNA syntetisoidaan käyttämällä käänteistranskriptaasia "Super Script" (BRL) valmistajan ohjeiden mukaisesti.

35 3. cDNA-kirjaston konstruointi

Konstruoidaan cDNA-kirjasto käyttämällä kirjasto-IV-cDNA-reagenssipakkausta (Invitrogen). Saadaan 50 cDNA-poolia,

jotka sisältävät kukin noin 5000 yksittäistä transformanttia.

4. PCR

- 5 PCR suoritetaan seuraavissa standardiolosuhteissa: 100 pmol kutakin aluketta, 10 μ l 10X PCR-puskuria (Perkin-Elmer), 40 μ l dNTP 0,5 mM, 2 μ l yksijuosteista cDNA:ta (tai noin 100 ng kromosomaalista DNA:ta tai 100 ng PCR-fragmenttia), H₂O:ta 100 μ l:aan, 2,5 U Taq-polymeraasia. Syklit käsittävät 3 x
10 (40 °C/2 min, 72 °C/2 min, 94 °C/1 min), sen jälkeen 30 x (60 °C/2 min, 72 °C/2 min, 94 °C/1 min).

B. Tulokset ja pohdinta

1. Polyporus pinsitus-lakkaasin kloonaukset

- 15 PCR suoritetaan alukkeella #3331:
ACCAGNCTAGACACGGGNTC/AGATACTG/ACGNGAGAGCGGAC/TTGCTGGTC
ACTATCTTCGAAGATCTCG
ja alukkeella #3332: CGCGGCCGCTAGGATCCTCACAATGGCCAA/CTCTCTG/
CCTCG/ACCTTC.
- 20 Saadaan kirkas vyöhyke ko'olla noin 1500 emäsparia. DNA sulatetaan NotI/HindIII:lla, ja fraktioidaan agarosigeelillä. Ylempi vyöhyke (fragmentti #42) puhdistetaan ja kloonataan Aspergillus-vektoriin pHD423. Ei saada lainkaan transformantteja. Suoritetaan useita yrityksiä kloonata fragmentin, mukaan lukien uudelleensulatus restriktioentsyymeillä,
25 päätyjen fosforylointi, täyttäminen klenow'illa, ja tylppäpääkloonaukset SmaI:lla katkaistussa pUC18:ssa, ilman menestystä. Hybridisointi lakkaasikoettimella, joka perustuu lakkaasiin, joka kuvataan julkaisussa Coll et al., edellä, osoittaa,
30 että PCR-tuote voisi olla P. pinsitus-lakkaasi. Eräässä uudessa yrityksessä PCR-fragmentin kloonamiseksi suoritetaan uusi PCR-reaktio, käyttäen samoja olosuhteita kuin fragmentilla #42. Jälleen tuloksena on fragmentti, jonka koko on noin 1500 emäsparia (fragmentti #43). Tällä kertaa
35 fragmentti katkaistaan HindIII/BamRI:llä, ja liitetään HindIII/BamHI:llä katkaistuun pUC18:aan. Kolmen kloonin, #43-/A, -B, -G, havaitaan sisältävän fragmentin, jonka koko on

1500 emäsparia. Osittainen sekvensöinti paljastaa, että nämä fragmentit ovat lakkaasin sukuisia.

2. Polyporus pinsitus-lakkaasin ekspressointi

- 5 Lakkaasin ekspressöimiseksi fragmentti #43 liitetään signaalisekvenssiin sellulaasista, jonka koko on 43 kD. Aluketta pHD433 (TAGCGGATCCCACAATGCGTTCCTCCCCCTCCTCCCGTCCGCCGTTGTG GCGGCCCTGCCGGTGTGGCCCTTGCCGGCATTGGGCCCCGTCGCGGACC) käytetään standardi-PCR-reaktiossa pUC-"eteenpäin"-alukkeella (New
10 England Biolabs). Kaikkia kolmea kloonia käytetään templaateina jotta minimoitaisiin vaara, että työskennellään DNA:-lla, joka sisältää virheitä.

- PCR:llä luotu DNA reaktiosta alukkeen pHD433 ja templaatin
15 43-A ja 43-G kanssa katkaistaan HindIII/BamHI:llä, ja kloonataan Aspergillus-ekspressiovektoriin pHD414 (kuvataan alla yksityiskohtaisesti). Saadaan useita transformantteja.

- Kloonit pHD433/43A-1,2, pHD433/43G-2, -3 transformoidaan A.
20 oryzae'en. Transformantit kustakin transformoinnista (välillä 3 - 10) analysoidaan lakkaasintuotannon suhteen. Aktiivisuutta saadaan vain pHD433/43G-3:lla. Positiiviset transformantit (numerot 1, 4, 6) eristetään uudelleen amdS-levyillä, ja testataan uudelleen. Lisätransformointikierroksella saadaan edelleen 10 transformanttia pHD433/43G-3:lla. Kloonit
25 #20, 23, 26, 28, ja 29 ovat positiivisia. Kloonit eristetään uudelleen, ja kaksi yksittäistä isolaattia analysoidaan lakkaasiekspression suhteen puolikvantitatiivisesti värinkehityksellä ABTS-määrityksellä pH-arvossa 4,5. Asteikolla + -
30 +++, useilla klooneilla nähdään kohtuullinen/voimakas lakkaasin ekspressio.

- Suoritetaan edelleen kloonaus täysimittaisen kloonin tunnistamiseksi. Ksylidiini-indusoitu cDNA-kirjasto, joka koostuu
35 noin 350 000 transformantista, seulotaan käyttämällä fragmenttia #42-4 koettimena. Havaitaan yli 100 positiivista kloonia. Kloonit puhdistetaan, seulotaan uudelleen, ja ana-

lysoidaan "Southern blots"-menetelmällä. Kaksi pisintä kloonina karakterisoidaan edelleen DNA-sekvenssimäärityksellä. Pisimpien kloonien havaitaan olevan identtisiä, ja niiden havaitaan sisältävän poly-A-jakson 3'-päässä ja alkavan aminohaposta numero 4 aminotermiinaalisessa päässä. Eri klooneista määritetään osittainen DNA-sekvenssi.

Sitten pHD433/43G-3:a käytetään lisäkloonaustutkimuksissa seuraavassa luvussa IV kuvatulla tavalla.

10

III. Muiden Polyporus pinsitus-villityyppi-lakkaasientsyymien puhdistus ja karakterisointi

a. Materiaalit ja menetelmät

1. Kasvatusolosuhteet

15 Ravistelupulloja (250 ml väliainetta/2,8-l välilevyllinen kolvi) siirrostetaan useilla agarpaloilla, jotka on otettu P. pinsitus'in viikon vanhasta PDA-levyistä. Väliaine sisältää, litraa kohden, 10 g glukoosia, 2,5 g L-asparagiinia, 0,2 g L-fenyylialaniinia, 2,0 g hiivauutetta, 2,0 g
20 KH_2PO_4 :ää, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:ta, 2,0 ml AMG-hivenainemetal-
ja, 0,002 g $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:ta, 1,0 g sitruunahappoa, tehty vesi-
johtovedellä, pH 5,0 ennen autoklavointia. Viljelmiä kasva-
tetaan 18 - 22 °C:ssa pyörivällä ravistelijalla vähäisellä
sekoituksella (~100 r/min). 7 päivän kuluttua kunkin ravis-
25 telupullon pH säädetään happamaan pH-arvoon ~6,0 lisäämällä
0,25 ml 5 N NaOH:ta, ja viljelmät indusoidaan lisäämällä
kunkin pulloon 0,5 ml 2,5-ksylidiinikantaliuosta (ksyli-
diini liuotettu 1:10 etanoliin). Pulloja inkuboidaan vielä
24 tuntia, jolloin viljelmäsupernatantti kustakin pullosta
30 otetaan talteen.

2. Materiaalit

Puskureina käytetyt kemikaalit ovat kaupallisia tuotteita, jotka ovat ainakin reagenssilaatua. Endo/N-glukosidaasi F on
35 yhtiöstä Boehringer-Mannheim. Kromatografia suoritetaan
Pharmacia FPLC:llä. Spektroskooppiset määritykset suorite-

taan joko spektrofotometrillä (Shimadzu PC160) tai mikrole-
vylukijalla (Molecular Devices).

3. Puhdistus

5 Kasvatusliemi suodatetaan ensin juustovaatteella ja sentri-
fugoidaan nopeudella 1000 x g gelatiinimaisen vaaleanpuner-
tavan ksyliidiinipolymeerin poistamiseksi. Sitten superna-
tantti suodatetaan Whatman #2-paperilla, ja konsentroidaan
1500 ml:sta 250 ml:ksi S1Y100:lla (Amicon, spiraalikonsent-
10 roija) 4 °C:ssa. Konsentroitunut liemi laimennetaan vedellä
kunnes se saavuttaa tason 0,8 mS (tasolta 2,5 mS), ja kon-
sentroidaan sitten S1Y100:lla 250 ml:ksi. Pesty liemi, sula-
tettu -20 °C:sta yön yli pakastuksen jälkeen, alistetaan
Whatman #2-paperisuodatukselle jäljellä olevan vaaleanpuner-
15 tavan materiaalin poistamiseksi, ja sitten pH säädetään
NaOH:lla pH-arvosta 6,1 pH-arvoon 7,7. Tämä kellertävä lie-
mi, 275 ml, jonka konduktanssi on 0,8 mS, lisätään Q-Sepha-
rose XK-26-kolonnille (~64 ml geeliä), joka on tasapainotet-
tu 10 mM Tris-HCl:llä, pH 7,7, 0,7 mS. Ensimmäinen aktiivi-
20 nen lakkaasifraktio kulkee läpi tasapainotuspuskurilla li-
säyksen ja pesun aikana. Eluointi suoritetaan lineaarisella
gradientilla 0 - 0,5 M NaCl:ää tasapainotuspuskurissa 8,8
kerrostilavuudella. Toinen ja kolmas aktiivinen fraktio
eluoituvat kohdalla 0,15 ja 0,35 M NaCl, vastaavasti. Ei
25 havaita lisää aktiivisia fraktioita, kun kolonni pestään
peräkkäin 2 M NaCl:llä ja 1 mM NaOH:lla. Aktiiviset fraktiot
yhdistetään, säädetään tasolle ~10 mS, konsentroidaan Cent-
ricon-10:llä (Amicon), ja lisätään sitten Superdex 75:lle
(HR10/30, 24-ml, Pharmacia), joka on tasapainotettu 10 mM
30 Tris-HCl:llä, 0,15 M NaCl, pH 8, 14 mS. Lisäybspuskurilla
eluoinnin aikana eluoidaan pois lakkaasifraktioita käyttäen
kaikille kolmelle Q-Sepharose-fraktiolle samaa eluointitila-
vuutta, mikä osoittaa hyvin samanlaisen natiivimolekyyli-
massan. Lakkaasin puhtaus testataan SDS-PAGE:lla.

4. Proteiininianalyysi

PAGE ja natiivi-IEF suoritetaan Mini Protean II- ja malli 111 Mini IEF-soluilla (Bio-Rad). "Western blots"-analyysi suoritetaan Mini trans-blot-solulla (Bio-Rad) alkalinen fosfataasi-määritysreagenssipakkauksella (Bio-Rad). Primääriset vasta-aineet laimennetaan 1000-kertaisesti "blotting"-määrityksen aikana. N-terminaalisen päään sekvensöinti suoritetaan Applied Biosystems (ABI) 476A-proteiinisekvensöijällä käyttämällä nestefaasi-TFA-vapautusta katkaisuun ja linjaan kytkettyä HPLC:tä PTH-aminohappojen tunnistukseen. Käytetään standardi-Fast Cycles- ja Pre-Mix-puskurijärjestelmää valmistajan ohjeiden mukaan. Deglykosylointi glykosidaasilla suoritetaan seuraavalla tavalla: 3 µg proteiinia ja 3,6 yksikköä glykosidaasia seoksessa, jossa on 0,25 M NaAc:tä, pH 5, 20 mM EDTA:ta, 0,05 % 2-merkaptoetanolia, inkuboidaan 18 tunnin ajan 37 °C:ssa ovalbumiinin ja naudanseerumialbumiinin kanssa, jotka toimivat positiivisena ja negatiivisena kontrollina, vastaavasti, ja liikkuvuus havaitaan SDS-PAGE:-lla.

20

Aminohappoanalyysi ekstinktiokertoimien määrittämiseksi suoritetaan käyttämällä Amino Quant 1090 HPLC-järjestelmää yhtiöstä Hewlett Packard. Suoritetaan lyofilisoitujen näytteiden mikroaallolla helpotettu höyryfaasihydrolyysi käyttämällä MDS-2000-hydrolyysiasemaa (CEM, Matthews, NC). 6 N HCl:ää, joka sisältää 1 % fenolia sieppaajana, käytetään happohöyryjen luomiseen. Hydrolyysiaika on 20 min paineessa 482 kPa (70 psi) (~148 °C). Hydrolysoidut näytteet lyofilisoidaan, ja liuotetaan uudelleen 20 µl:aan 500 pmol/µl sarkosiinia ja norvaliinia sisäisinä standardeina. 1 µl injisoidaan ja analysoidaan valmistajan ohjeiden mukaisesti.

30

B. Tulokset ja pohdinta

1. Puhdistus

35 Aikaisemmin karakterisoidun P. pinsitus-lakkaasin pI-arvo on ~3,5. Huomattava lakkaasiaktiivisuus havaitaan kuitenkin pH-arvossa 7,7 esitasapainotetun Q-Sepharose:n läpiajofraktios-

sa. Gradienttieluoinnin aikana kolonnista tulee pois vielä yksi aktiivinen fraktio ennen kuin aktiivista fraktiota odotetaan aluksi. UV/näkyvän valon spektrit ja SDS-PAGE osoittavat, että kaikki kolme fraktiota sisältävät pääasiassa lakkaasia. Geelisuodatuksella edelleen puhdistamisen jälkeen kahdelle uudelle fraktiolle havaitaan eri pI-arvot natiivissa ei-denaturoivissa olosuhteissa, ja nähdään olevan yhdenmukainen eluoitusjärjestyksen kanssa.

10 2. Karakterisointi

Q-Sepharose-eluaateista peräisin olevat puhtaat lakkaasivalmisteet käyttäytyvät melko hyvin määriteltynä vyöhykkeenä SDS-PAGE:lla kohdalla ~63 kDa. Deglykosyloinnilla havaitaan ~14 % paino/paino hiilihydraatteja SDS-PAGE:lla liikkuvuuden muutoksen perusteella. Natiivi-IEE:llä lakkaasivalmisteilla on pI-vyöhykkeet 6 - 6,5, 5 - 6,5, ja 3,5. ABTS-agaroosipäällyste soittaa, että kaikki vyöhykkeet ovat aktiivisia. Kullakin muodolla nähdään IEF-oloissa puolestaan useita isoformeja.

20

Neutraaleilla ja happamilla muodoilla on tyypillinen UV/näkyvä-spektri maksimien ollessa kohdalla 605 ja 275 nm. A_{275}/A_{605} -suhde on 30 - 40. Happaman/neutraalin muodon spektrissä on huippu kohdalla 276 nm ja olka kohdalla noin 600 nm.

25

N-terminaalinen sekvensöinti osoittaa, että neutraaleilla ja neutraali/happamilla muodoilla on samat ensimmäiset 29 tähdettä (taulukko 1). Happaman muodon N-terminaalinen pää täsmää 100-%:isesti aikaisemmin karakterisoidun muodon kanssa. Kaikilla kolmella muodolla on verrattavissa oleva ristireaktiivisuus aikaisemmin karakterisoitua muotoa vastaan kohotettu ja vasta-aineita kohtaan.

35

Taulukko 1. *P. pinsitus*-lakkaasien rakenteelliset ja entsyymaattiset ominaisuudet

	Muoto	N-terminaalinen pää	LACU	$\Delta A_{405\text{min-1}}$ (ABST)
5	Hapan	GIGFVA D LTITNAAVSPDGFQRQAVVVG	92	4000
	Hapan-Neutraali	A*****(*)VVVA**P*****L*D*I****	75	4000
	Neutraali	A*****(*)VVVA**P*****L*D*I****	32	1000

10 *: Sama tähde happamaan muotoon verrattuna. (): heikko signaali

3. Lakkaasiaktiivisuus

15 Kolmen muodon spesifiset aktiivisuudet (arvona A_{275}) testataan sekä ABTS- että syringaldatsiinihapetuksella. Kolmen muodon pH-aktiivisuusprofiilien muodot ja optimit ovat hyvin lähellä toisiaan: kaikilla on optimit tasolla $\text{pH } 4$ ja $\text{pH } 5 - 5,5$ ABTS- ja syringaldatsiinihapetukselle, vastaavasti.

20 IV. Polyporus pinsitus-lakkaasientsyymien ja geenien moninkertaisten kopioiden eristys

a. Materiaalit ja menetelmät

1. Kannat

25 Alla kuvatuissa menetelmissä käytetään seuraavia kantoja: *E. coli* K802(e14-(mrca), mcrB, hsdR2, galK2, galT22, supE44, metB1; Clonotech); *E. coli* XL-1 Blue (recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB, lacIqZDM15, Tn10(tet^r)]); Stratagene) ja *Polyporus pinsitus* CBS 678.70.

30 2. Genomi-DNA:n eristys

P. pinsitus-viljelmiä kasvatetaan 500 ml:ssa YG:tä (0,5 % hiivauutetta, 2 % dekstroosia) huoneenlämpötilassa 3 - 4 päivän ajan. Myseelejä kerätään "miracloth"-vaatteen läpi, pestään kahdesti TE:llä, ja pakastetaan nopeasti nestetypessä. Pakastettuja myseeleitä säilytetään $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. DNA:n eristämiseksi myseelit jauhetaan hienoksi jauheeksi sähkökahvimyllyllä. Jauhetut myseelit suspendoidaan uudelleen TE:hen lopulliseen tilavuuteen 22 ml. 4 ml 20-%:ista SDS:ää lisätään sekoittaen kääntämällä ylösalaisin, minkä jälkeen

inkuboidaan huoneenlämpötilassa 10 min ajan. Näyte uutetaan varovasti fenoli:kloroformilla, ja sentrifugoidaan faasien erottamiseksi. Vesifaasi kerätään, ja lisätään 400 µl proteinaasi A:ta (10 mg/ml kantaliuos). Näytettä inkuboidaan 30 min ajan 37 °C:ssa, minkä jälkeen seuraa fenoli:kloroformiuutto. Vesifaasi saostetaan lisäämällä 0,1 tilavuutta 3 M Na-asetaattia, pH 5,2, ja 2,5 tilavuutta 95-%:ista etanolia, ja pakastetaan 1 tunnin ajan 20 °C:ssa. Kun on sentrifugoitu DNA:n saostamiseksi, pelletti suspendoidaan uudelleen 6 ml:aan TE:tä, ja lisätään 200 µl keitettyä RNAasi A:ta (10 mg/ml kantaliuos). Kun on inkuboitu 37 °C:ssa, lisätään 100 µl proteinaasi A:ta (10 mg/ml kantaliuos), minkä jälkeen inkuboidaan 37 °C:ssa 30 min ajan. Näyte uutetaan kahdesti fenoli:kloroformilla. Vesifaasiin lisätään 0,1 tilavuutta 3 M Na-asetaattia ja 2,5 tilavuutta, ja näytettä pakastetaan 1 tunnin ajan -20 °C:ssa. Sentrifugoidaan, minkä jälkeen pelletti suspendoidaan varovasti uudelleen 400 µl:aan TE:tä, ja lisätään 40 µl Na-asetaattia ja 1 ml 95-%:ista etanolia. DNA pelletöidään sentrifugoimalla, ja pelletti pestään 70-%:isessa etanolissa. Lopullinen pelletti suspendoidaan uudelleen 250 µl:aan TE:tä.

3. RNA'n valmistus

RNA:ta eristetään myseeleistä, jotka kerätään P. pinisitusviljelmistä, joita on joko indusoitu lakkaasin ekspressiota varten lisäämällä 2,5-ksylidiiniä, tai jotka ovat induoimattomia. Myseelit pestään ja pakastetaan nopeasti nestemäisessä N₂:ssa. Pakastettuja myseeleitä jauhetaan hienoksi jauheeksi sähkökahvimyllyllä. Jauhe suspendoidaan välittömästi 20 ml:aan uuttopuskuria (0,2 M Tris-HCl, 0,25 M NaCl, 50 mM EGTA, 0,8 % tri-isopropyyliinaftaleenisulfonihappoja, 4,8 % p-aminosalisyylihappoa, pH 8,5). Kaikki RNA-uuttoon tarkoitetut liuokset valmistetaan dietyylipyrokarbonaatti(DEP)-käsitellyllä vedellä. Näytettä pidetään jäissä, ja lisätään 0,5 tilavuutta TE-kyllästettyä fenoli:kloroformia. Näyte sekoitetaan hyvin kääntelemällä ylösalaisin 2 min ajan, ja faasit erotetaan sentrifugoimalla. Vesifaasi sääs-

tetään, ja orgaaninen faasi uutetaan 2 ml:lla uuttopuskuria, ja inkuboidaan 5 min ajan 68 °C:ssa. Kun on sentrifugoitu faasien erottamiseksi, vesifaasit yhdistetään, ja uutetaan useita kertoja fenoli:kloroformilla, kunnes rajapinnalla ei ole enää lainkaan proteiinia. Vesifaasiin lisätään 0,1 tilavuutta 3 M Na-asetaattia, pH 5,2 ja 2,5 tilavuutta 95-%:ista etanolia RNA:n saostamiseksi, ja näytettä pakastetaan 2 tuntia -20 °C:ssa. RNA pelletöidään, ja suspendoidaan uudeleen DEP-veteen, jossa on RNAasin estäjää.

10

4. DNA-sekvensöinti

Nukleotidisekvenssit määritetään käyttämällä TAQ-polymerasisyklisekvensöintiä fluoresoivasti leimatuilla nukleotideilla, ja reaktiot ajetaan elektroforeesilla Applied Biosystems-yhtiön automaattisella DNA-sekvensöijällä (malli 363A, versio 1.2.0).

5. Geenikirjastojen valmistus

Konstruoidaan P. pinsitus'in kaksi kokovalittua geenikirjastoa. Kirjasto, jossa on 5 - 6 kiloemäksen BamHI-fragmentteja, konstruoidaan pBluescript+:aan. Genomi-DNA sulatetaan BamHI:llä, ja sulatus ajetaan elektroforeesilla preparatiivisella agarosigeelillä (IBI). Alue, joka sisältää 5 - 6 BamHI-fragmenttia, viipaloidaan geelistä. DNA eristetään geelistä käyttämällä Geneclean-reagenssipakkausta (BIO 101). DNA liitetään pBluescript-plasmidiin, joka on aikaisemmin sulatettu BamH:lläI ja defosforyloitu BAP:llä (GIBCO BRL), E. coli XL-1 Blue-kompetentit solut (Stratagene) transformoidaan liitostuotteella, ja saadaan 12 000 valkoista koloniaa.

Kirjasto, jossa on 7 - 8 kiloemäksen BamHI/EcoRI-fragmentteja, konstruoidaan pUC118:aan. 10 µg genomi-DNA:ta sulatetaan BamHI:llä ja EcoRI:llä, ja käsitellään BAP:llä (GIBCO BRL). Kompetentteja E. coli XL-1 Blue-soluja transformoidaan liitostuotteella, ja kirjasto sisältää ~8 000 rekombinanttia.

35

Kokonaisgenomikirjaston valmistamiseksi lambda EMBL4:ään, 25 μg P. pinsitus'in genomi-DNA:ta sulatetaan osittain Sau3A:-lla. Sulatuksen jälkeen DNA ajetaan elektroforeettisesti preparatiivisella alhaisessa lämpötilassa sulavalla agarosigeelillä, ja geelistä viipaloidaan vyöhyke, joka sisältää kooltaan 9 - 23 kiloemästä olevaa DNA:ta. DNA uutetaan geelistä käyttämällä β -agarosia (New England Biolabs). Eristetyt EMBL4-varret (Clonetech) toimittajan ohjeiden mukaan. Liitostuote pakataan in vitro käyttämällä Gigapack II-reagenssipakkausta (Stratagene). Kirjasto titrataan käyttämällä E. coli K802-soluja. Monistamattoman kirjaston arvioidaan sisältävän 35 000 toisistaan riippumatonta rekombinanttia. Kirjasto monistetaan E. coli K802-soluja käyttämällä.

15

6. "Southern Blot"- ja "Northern Blot"-ajot
DNA-näytteet ajetaan elektroforeettisesti agarosigeeleillä TAE-puskurissa standardiprotokollia käyttämällä. RNA-näytteet ajetaan elektroforeettisesti agarosigeeleillä, jotka sisältävät formaldehydiä. Sekä DNA- että RNA-geelit siirretään Zeta-Probe-membraanille (BIO-RAD) käyttämällä joko kapilläärivaikutusta alkalisisissä oloissa tai tyhjötäplänsiirtäjää. Siirtämisen jälkeen DNA-geelit UV-verkkoutetaan. Täplät esihybridisoidaan 1 tunnin ajan 65 °C:ssa seoksessa, jossa on 1,5X SSPE, 1 % SDS, 0,5 % rasvatonta kuivamaitoa, ja 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lohenmaiti-DNA:ta. Radioaktiivisia koettimia lisätään suoraan esihybridisointiliuoksiin, ja hybridisointeja jatketaan yön yli 65 °C:ssa. Täpliä pestään 2XSSC:llä 5 min ajan 65 °C:ssa, ja kahdesti 65 °C:ssa 30 min ajan seoksella, jossa on 0,2 X SSC:tä, 1 % SDS:ää, 0,1 % Na-pyrofosfaattia.

Valmistetaan radioaktiivisesti leimattuja koettimia käyttämällä α - ^{32}P -dCTP:tä ja "nick"-translaatioreagenssipakkausta (GIBCO-BRL).

35

7. Kirjastoseulonta

Koon mukaan valittujen 5 - 6 kiloemäksen BamHI- ja 7 - 8 kiloemäksen BamHI/EcoRI-kirjastojen seulomiseksi ~500 koloniaa "LB carb"-levyillä, ja koloniat kohotettiin Hybond N⁺-suodattimiin (Amersham) standardimenettelytapoja käyttämällä. Suodattimet UV-verkkoutetaan neutraaliin pH-arvoon säätämisen jälkeen. Suodattimia esihybridisoidaan 1 tunnin ajan 65 °C:ssa seoksessa, jossa on 1,5X SSPE:tä, 1 % SDS:ää, 0,5 % rasvatonta kuivamaitoa, 200 µg/ml lohenmaiti-DNA:ta.

"Nick"-translatoidut koettimet lisätään suoraan esihybridisointiliuokseen, ja hybridisointeja suoritetaan yön yli 65 °C:ssa.

Geenipankin seulomiseksi EMBL:ssä, monistetun kirjaston sopivia laimennoksia siirrostetaan E. coli K802-soluilla 100 mM NZY-päällysagaroosille. Täplät nostetaan Hybond N⁺-membraaneille (Amersham) standardimenettelytapoja käyttämällä. DNA verkkoutetaan membraaneihin UV-verkkoutusta käyttämällä. Suodattimet esihybridisoidaan ja hybridisoidaan käyttämällä samoja olosuhteita kuin edellä mainittiin.

Tulokset ja pohdinta

1. Lakkaasigeenin moninkertaisten kopioiden eristäminen

P. pinsitus'in genomi-DNA:ta sulatetaan useilla eri restriktioentsyymeillä "southern"-analyysiä varten. Täplä koetetaan cDNA-insertillä (eristetty BamHI/SphI-fragmenttina pYES-vektorista), joka on leimattu α -³²P-dCTP:llä. Täplä hybridisoidaan ja pestään edellä kuvatulla tavalla. cDNA hybridisoituu useisiin restriktiofragmentteihin useimmilla entsyymeistä, mikä viittaa siihen, että genomissa on moninkertaisia lakkaasigeenejä. Koska cDNA hybridisoituu BamHI-fragmenttiin, jonka koko on ~5,5 kiloemästä, konstruoidaan kirjasto P. pinsitus'ista olevista 5 - 6 kiloemäksen BamHI-fragmenteista.

2. Geenikirjastojen seulonta

- Kirjastojen seulonnasta saadut tulokset esitetään yhteenvedona taulukossa 2. 5 - 6 kiloemäksen BamHI-kokovalittu kirjasto seulotaan alkuperäisellä cDNA-kloonilla, joka on leimattu ^{32}P :llä. Seulotaan noin 30 000 koloniaa suorittaen hybridisoinnit $65\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Plasmidi-DNA eristetään kahdesta positiivisesta koloniasta, ja sulatetaan BamHI:llä insertin koon tarkistamiseksi. Molemmat kloonit sisältävät ~5,5 kiloemäksen BamHI-insertin. Kloonattu insertti (LCC3) sekvenssoidään jommasta kummasta päästä; sekvenssillä on homologiaa cDNA:n kanssa, mutta selvästikään se ei ole cDNA:n koodittama lakkaasi. LCC3:n osittainen DNA-sekvenssi osoittaa myös, että LCC3-pUC118-klooni ei sisällä täyttä geeniä.
- 15 BamHI/EcoRI-kaksoissulatetun DNA:n "southern blot"-analyysistä osoitetaan, että cDNA hybridisoituu ~7,7 kiloemäksen fragmenttiin. Konstruoidaan pUC118:aan koon mukaan valittu kirjasto, joka sisältää 7 - 8 BamHI/EcoRI-fragmentteja. Saadaan yhteensä ~8 000 toisistaan riippumatonta koloniaa, ja seulotaan hybridisoimalla ^{32}P -leimatulla insertillä. Plasmidi-DNA eristetään positiivisista kolonioista, ja sulatetaan BamHI:llä ja EcoRI:llä. Plasmidien restriktioanalyysi osoittaa, että ne kuuluvat kahteen luokkaan. Toinen luokka (LCC4) sisältää 4 kloonia, jotka ovat kaikki identtisiä ja joissa on ~7,7 kiloemäksen BamHI/EcoRI-insertti, joka hybridisoituu cDNA:han. Toinen luokka (LCC1) sisältää kaksi kloonia, jotka ovat identtisiä ja joissa on ~7,2 kiloemäksen insertit, jotka hybridisoituvat cDNA:han. Kloonien LCC1 ja LCC4 osittainen DNA-sekvenssointi osoittaa, että klooni 21 on alkuperäisen cDNA:n genomiklooni, kun taas LCC4 koodittaa toista lakkaasia. LCC1:n osittainen DNA-sekvenssi osoittaa, ettei pUC118-klooni sisällä täyttä geeniä, ja että tarvitaan fragmentti ylävirtaan EcoRI-kohdasta.
- 35 Samanaikaisesti koon mukaan valitun 7 - 8 BamHI/EcoRI-kirjaston konstruoinnin kanssa konstruoidaan P. pinisitus-geenipankki EMBL4:ään, joka sisältää ~35 000 toisistaan

riippumatonta yhdistelmä-DNA-fagia. Poimitaan 10 positiivista täplää, ja puhdistetaan. Puhdistetuista fagilysaateista eristetään DNA. EMBL-DNA'iden restriktiosulatukset osoittavat, että klooneja on kolmea luokkaa. Ensimmäisen luokan (11GEN) määrittävät kaksi sukulaista, joiden insertit sisältävät samankokoisen BamHI/EcoRI-fragmentin kuin LCC1, joka hybridisoituu LCC1-inserttiin. Toinen luokka (12GEN) sisältää yhden kloonin, jolla on eri restriktiomalli kuin 11GEN-luokalla, ja jonka insertti sisältää eri restriktiomallin kuin 11GEN-luokka, ja jonka insertti sisältää ~5,7 kiloemäksen BamHI/EcoRI-fragmentin. Kolmannen luokan määrittelee yksi ainoa kloni, joka sisältää ~3,2 kiloemäksen BamHI/EcoRI-fragmentin, joka hybridisoituu LCC1-inserttiin. DNA-sekvenssianalyysi osoittaa, että kloni 11GEN sisältää LCC1-BamHI/EcoRI-fragmentin ja sekä 5'- että 3"-reuna-alueen. Osoitetaan myös, että kloni 12GEN sisältää osan LCC1-insertistä.

P. pinisitus-EMBL-geenipankki seulotaan myös LCC3-BamHI-insertillä koko geenin kloonamiseksi. Siirrostetaan noin 30 000 täplää, ja kohotetaan hybridisoinnista. Tunnistetaan ja puhdistetaan viisi täplää, jotka hybridisoituvat LCC3(-BamHI/EcoRI)-inserttiin. DNA eristetään puhdistetuista fagikannoista. P. pinisitus-geeni-DNA:n "Southern"-analyysi osoittaa, että LCC3-BamHI-insertti hybridisoituu ~7 kiloemäksen EcoRI-fragmenttiin. Restriktiosulatukset ja "southern"-analyysit osoittavat, että klooneista 4 sisältää restriktiofragmentteja, jotka hybridisoituvat EcoRI/BamHI-fragmenttiin (1,6 kiloemästä), ja että kloonit kuuluvat kolmeen luokkaan. Ensimmäisen luokan määrittelee yksi ainoa kloni (LCC5), jonka insertti sisältää 3 kiloemäksen EcoRI-fragmentin, joka hybridisoituu LCC3-BamHI/EcoRI-fragmenttiin. Erään toisen luokan määrittelee kloni (LCC2), jonka insertti sisältää ~11 kiloemäksen EcoRI-fragmentin, joka hybridisoituu LCC3-BamHI/EcoRI-inserttiin. Kolmannen luokan määrittelevät kaksi kloonia, jotka eivät ole identtisiä mutta jotka sisältävät useita samoista restriktiofragmenteista; molemmat

näistä klooneista sisältävät ~7,5 kiloemäksen EcoRI-fragmentin, joka hybridisoituu LCC3-inserttiin. Tämän kolmannen luokan edelleen analysointi osoittaa, että ne ovat identtisiä kloonin LCC4 kanssa. LCC5:n ja LCC2:n osittainen DNA-sekvensöinti soittaa, että molemmat näistä klooneista koodittavat lakkaaseja; kumpikaan ei kuitenkaan ole identtinen millekään edellä mainituista lakkaasigeeneistä (LCC1, LCC3 tai LCC4). Tässä pisteessä kloonataan viisi ainutlaatuista lakkaasigeeniä; LCC5:stä ja LCC2:sta alkloonatut fragmentit eivät kuitenkaan sisällä täysiä geenejä.

Kloonista LCC5 olevan 3 kiloemäksen EcoRI-fragmentin DNA-sekvensöinnistä määritetään, että ~200 emäsparia N-terminaalista päästä on ylävirtaan EcoRI-kohdasta. Käytetään 380 emäsparin EcoRI/MluI-fragmenttia LCC5:stä tunnistamaan LCC5-EMBL-kloonista olevan MluI-fragmentin alikloonausta varten. ~4,5 MluI-fragmentti LCC5-EMBL-kloonista alikloonataan sekvensöintiä varten, ja sen osoitetaan sisältävän N-terminaalisen sekvenssin.

20

LCC3-lakkaasigeenin N-terminaalisen puoliskon kloonamiseksi, P. pinsitus-EMBL-geenipankki koetetaan ~750 emäsparin BamHI/StuI-restriktiofragmentilla LCC3-pUC118-kloonista. Seulotaan noin 25 000 täplää, ja 5 täplää vaikuttaa hybridisoituvan koettimen kanssa. Edelleen puhdistettaessa vain kolme klooneista on edelleen positiivisia. Klooneista kaksi antaa hyvin voimakkaat signaalit, ja näistä fageista eristetyt DNA:n restriktiosulatuksot osoittavat, että molemmat sisältävät inserteissään ~750 emäsparin BamHI/StuI-fragmentin, ja että nämä kaksi kloonaa eivät ole identtisiä, mutta osittain päällekkäisiä. "Southern"-analyysin pohjalta ~8,5 kiloemäksen fragmentti näistä klooneista alikloonataan sekvensöintiä varten. EcoRI-fragmentin osoitetaan sisältävän koko geenin.

35

LCC2-lakkaasigeenin N-terminaalisen puoliskon kloonamiseksi P. pinsitus-geenipankki EMBL4:ssä koetetaan EMBL-LCC2-kloo-

nin ~680 emäsparin EcoRI/PvuI:llä. 30 000 täplää seulotaan hybridisoimalla 65 °C:ssa, ja 15 täplää vaikuttaa hybridisoituvan koettimen kanssa. Kaikki 15 puhdistetaan, ja DNA eristetään. Klooneit voidaan sijoittaa restriktiomallien perusteella neljään luokkaan. Seitsemän klooneista ovat kaikki sisäruksia, ja ovat identtisiä LCC2:n alkuperäisen EMBL-kloonin kanssa. Toisen luokan määrittelee 3 kloonia, jotka ovat sisäruksia. ~4 kiloemäksen HindIII-fragmentti alikloonataan tästä luokasta sekvensöintiä varten, ja sen osoitetaan sisältävän LCC2:n N-terminaalisen puoliskon. Kolmannen luokan määrittelee yksi ainoa klooni, eikä sitä karakterisoida edelleen.

3. DNA-sekvensöinti

Viiden genomikloonin täydelliset DNA-sekvenssit määritetään kohdassa Materiaalit ja menetelmät kuvatulla tavalla. Kloonin LCC2 sekvensöinti soittaa, että se luultavasti koodittaa lakkaasin toista muotoa (neutraali pI), joka on eristetty edellä kuvatulla tavalla indusoidun P. pinsitus-viljelmän kasvatusliemestä. Verrataan N-terminaalista proteiinisekvenssiä neutraalin pI-arvon omaavasta lakkaasista ja LCC2:n koodittaman proteiinin ennustettua N-terminaalista päätä, ja niillä nähdään identtisyttä. Kloonin LCC2 koodittaman proteiinin ennustettu pI-arvo on 5,95, joka on hyvin sopusoinnussa kokeellisen pI-arvon kanssa, joka on määritetty lakkaasin toiselle muodolle ollen välillä 5,0 ja 6,5. Kuvioissa 1 - 5 (SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROT 1 - 5) esitetään geeniklooneille DNA-sekvenssit ja ennustetut translaatiotuotteet. LCC1:lla, kypsän proteiinin N-terminaalinen pää proteiinisekvensöinnillä määritettynä ja Von Heijne-säännöistä ennustettuna on Gly asemassa 22. N-terminaalinen pää on Gly-Ile-Gly-Pro-Val-Ala-. LCC2:lla kypsän proteiinin N-terminaalinen aminohappo proteiinisekvensöinnillä määritettynä on Ala asemassa 21. N-terminaalinen pää on Ala-Ile-Gly Pro-Val-Ala-. LCC3:lla kypsän proteiinin ennustettu N-terminaalinen aminohappo on Ser asemassa 22, N-terminaalisen pään ollessa Ser-Ile-Gly-Pro-Val-Thr-Glu-Leu-. LCC4:llä, ennustettu N-

terminaalinen aminohappo on Ala asemassa 23 N-terminaalisen
pään ollessa Ala-Ile-Gly-Pro-Val-Thr-. LCC5:llä ennustettu
N-terminaalinen aminohappo on Ala asemassa 24 N-terminaali-
sen pään ollessa Ala-Ile-Gly-Pro-Val-Thr-Asp. Geenien raken-
5 teellisen organisaation ja niiden koodittamien ennustettujen
proteiinien vertailu esitetään taulukossa 1. Nähdään, että
viidellä geenillä on erilaiset rakenteelliset organisaatiot
ja hieman erikokoisten proteiinien koodi. Tehdään myös ver-
tailu geenikloonien ennustetuista proteiineista ja muusta
10 sienilakkaasista. Taulukossa 2 esitetään vertaulu ennuste-
tuista lakkaaseista keskenään ja muihin sienilakkaaseihin.
Kloonilla LCC1 (ensin karakterisoitu indusoitu lakkaasi) on
suurin identtisyys (90 %) *Coriolus hirsutus*-lakkaasin ja
PM1-basidiomykeettilakkaasin (Coll et al., yllä) kanssa.
15 Muilla neljällä lakkaasilla on 64- - 80-%:inen identtisyys
C. hirsutus-lakkaasin kanssa. LCC3:n koodittamalla lakkaa-
silla on pienin identtisyys LCC1-lakkaasin ja muiden taulu-
kossa 2 esitettyjen sienilakkaasien kanssa. LCC2 vaikuttaa
olevan toinen edellä kuvatulla tavalla eristetty villityypp-
20 pilakkaasi; eristettyjen kloonien N-terminaalisten sekvens-
sien pohjalta vaikuttaa, että "neutraaleilla" ja happamilla
neutraaleilla" villityyppilakkaaseilla on sama LCC2-sekvens-
sin koodittama entsyymi.

25 Taulukko 1 P. pinsitis-geenikloonien rakenteellisen organi-
saation ja ennustettujen proteiinien vertailu.

	Geeni	# Introneita	Ennustetun prekursori- proteiinin koko	Ennustetun kypsän proteiinin koko	Ennustettu iso- elektrinen piste
30	21GEN	8	520	499	4,49
	23GEN	10	519	498	5,95
	24GEN	12	516	495	5,23
	31GEN	11	510	488	4,06
35	41GEN	11	527	504	4,07

Taulukko 2 *P. pinsitis*-lakkaasien ja muiden sienilakkaasien välinen aminohappoidenttisyys.

		21GEN	23GEN	24GEN	31GEN	41GEN	CRIPHA	CRIPHE	PBILAC	PM1
5	21GEN	----	79 %	64 %	70 %	72 %	90 %	91 %	64 %	80 %
	23GEN	79 %	----	65 %	66 %	69 %	80 %	81 %	62 %	74 %
	24GEN	64 %	65 %	----	61 %	65 %	64 %	65 %	61 %	63 %
	31GEN	70 %	66 %	61 %	----	75 %	69 %	70 %	64 %	69 %
	41GEN	72 %	69 %	65 %	75 %	----	71 %	72 %	64 %	71 %
10	CRIPHA	90 %	80 %	64 %	69 %	71 %	----	99 %	64 %	80 %
	CRIPHE	91 %	81 %	65 %	70 %	72 %	99 %	----	65 %	81 %
	PBILAC	64 %	62 %	61 %	64 %	64 %	64 %	65 %	----	65 %
	PMI	80 %	74 %	63 %	69 %	71 %	80 %	81 %	65 %	----

21GEN, 23GEN, 24GEN, 31GEN anti 41GEN = *P. pinsitis*-lakkaasikloonit

15 CRIPHA = *Coriolus hirsutis*-lakkaasi A

CRIPHE = *C. hirsutis*-lakkaasi B

PBILAC = *Phlebia radiata*-lakkaasi

PM1 = *Basidiomyceetti* PM1-lakkaasi (CECT2971)

20 5. "Northern blots"-menetelmä

RNA eristetään sekä ksylidiini-indusoidun viljelmän että indusoimattoman viljelmän myseeleistä. RNA-täplä siirretään membraanille elektroforeesin jälkeen, ja täplä koeteteaan cDNA-insertillä, tai pienellä fragmentilla, joka sisältää

25 23GEN-promoottorin ~100 emäsparia ja koodialueen ensimmäiset 100 emäsparia. Eräs transkripti, jonka koko on noin 1,8 kiloemästä, hybridisoituu sekä indusoituihin että indusoi-

mattomiin RNA-näytteisiin; ksylidiinin lisääminen viljelmään indusoi kuitenkin selvästi tämän viestin transkriptiota.

30

III. *P. Pinsitus*-lakkaasin ekspressio *Aspergillus*'issa

Materiaalit ja menetelmät

1. Kannat

A. *oryzae* A1560, A. *oryzae* HowB104 (fungamyyli poistettu, 35 pyrg), A. *oryzae* HowB101pyrg, A. *niger* Bo-1, A. *niger* Bo-80, A. *niger* ATCC1040, A. *niger* NRRL337, A. *niger* NRRL326, A. *niger* NRRL326, A. *niger* NRRL2295, A. *niger* ATCC11358, A. *niger* NRRL322, A. *niger* AT10864, A. *japonicus* A1438, A. *phoenicis*, A. *foetidus* N953.

40

2. Väliaineet

A. *niger*'in, A. *foetidus*'in ja A. *phoenicis*'in ravistelupulloviljelyä varten käytetään MY50-väliaineita (litraa kohden:

50 g maltodekstriiniä, 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:ta, 10 g KH_2PO_4 :ää, 2 g K_2SO_4 :ää, 2 g sitruunahappoa, 10 g hiivauutetta, 0,5 ml hivenainemetalleja, 2 g ureaa, pH 6,0). *A. oryzae* A1560- ja HowB101-kantojen ravistelupulloviljelyä varten käytetään MY51-väliainetta (litraa kohden: 30 g maltodekstriiniä, 2 mg MgSO_4 :ää, 10 g KH_2PO_4 :ää, 2 g K_2SO_4 :ää, 2 g sitruunahappoa, 10 g hiivauutetta, 0,5 ml hivenainemetalleja, 1 g ureaa, 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:ää, pH 6,0). *A. oryzae* HowB104-kantojen ravistelupulloanalyysiä varten käytetään MY51-maltoosiväliaineita (sama kuin MY51, mutta 50 g:lla maltoosia maltodekstriinin sijasta). *A. japonicus*-kantojen ravistelupulloanalyysiä varten käytetään M400-väliaineita (litraa kohden: 50 g maltodekstriiniä, 2 g MgSO_4 :ää, 2 g KH_2PO_4 :ää, 4 g sitruunahappoa, 8 g hiivauutetta, 0,5 ml hivenainemetalleja, 2 g ureaa, pH 6,0).

Viljelmiä, joita on kasvatettu yön yli protoplastinmuodostusta ja seuraavaa transformointia varten, kasvatetaan YEG:ssä (0,5 % hiivauute, 2 % dekstroosia). Kantoja varten, jotka ovat pyrg, täydennetään uridiinia lopulliseen konsentraatioon 10 mM.

3. Seulonta lakkaasintuotannon suhteen

Primäärisiä transformantteja seulotaan ensin minimaalisen väliaineen levyillä, jotka sisältävät 1 % glukoosia hiililähteenä ja 1 mM ABTS:ää lakkaasintuotannon suhteen testaamiseksi. Poimitaan transformantit, jotka antavat levyillä vihreät vyöhykkeet, ja itiöt puhdistetaan ennen ravistelupulloanalyysin suorittamista.

30

Ravistelupullonäytteitä sentrifugoidaan kasvatusliemen kirkastamiseksi. Laimeita tai laimennettuja kasvatuslieminäytteitä määritetään ABTS:n kanssa.

35

Tulokset ja pohdinta

1. Ekspressio ravistelupulloissa

Ensummäinen konstruoitu ekspressiovektori on pDSY1, joka sisältää TAKA-promoottorin, TAKA-signaalisekvenssin, P.

5 pinisitus-lakkaasi-cDNA:n alkaen kypsän N-terminaalisen pään kohdalla, ja AMG-terminaattorin. TAKA-signaalisekvenssi: lakkaasi-insertti konstruoidaan 2 vaiheessa. Luodaan ensin kohtasuunnatulla mutageneesillä AgeI-kohta alkaen lakkaasin kypsän koodausalueen emäsparin 107 kohdalla yhden ainoan
10 emäsparin vaihdolla, ja luodaan NsiI-kohta ~120 emäsparia lakkaasin lopetuskodonista alavirtaan (ACG GGT->ACC GGT ja TTC GCT->ATG CAT, vastaavasti). PCR-monistetaan pieni PCR-fragmentti, joka alkaa SfiI-kohdalla ja päättyy AgeI-kohtaan kohdassa 107 emäsparia lakkaasissa. Tämä fragmentti sisältää
15 palan TAKA-signaalisekvenssistä ja kypsän lakkaasi-cDNA:n ensimmäiset ~107 emäsparia. Tämän fragmentin edelleen DNA-sekvensöinti osoittaa, että siinä on yhden ainoan emäsparin muutos, joka johtaa Thr:n substituutioon Asn:llä kypsän lakkaasin asemassa 9. Tämä substituutio luo mahdollisen N-
20 liitetyn glykosylointikohdan. PCR-fragmentti ja AgeI/NsiI-fragmentit kloonataan pMWR1:een (kuvio 6), joka on sulatettu SfiI/NsiI:llä. Vektori pMWR1 sisältää TAKA-promoottorin, osan TAKA-signaalisekvenssistä, joka päättyy SfiI-kohdassa, ja TAKA-terminaattorin, NsiI-kohdan kanssa insertoituna
25 suoraan 5'-suuntaan terminaattorista. Tulokseksi saatua ekspressiovektoria (kuvio 7) käytetään kotransformoimaan useita isäntiä. Menetelmät Aspergillus-kantojen kotransformoimiseksi ovat kuten julkaisussa Christensen et al., yllä, kuvatut.

30

Toisessa lakkaasiekspressiovektorissa, DSY1:ssä tehty emäsmuutos, joka johtaa Thr:n substituutioon Asn:llä aminohapossa 9, palautetaan takaisin villityypiksi PCR-reaktiolla. Toinen ekspressiovektori pDSY2 on identtinen pDSY1:n kanssa
35 tätä yksinkertaista emäsmuutosta lukuunottamatta. Kolme eri A. oryzae-kantaa ja useita A. niger-kantoja kotransformoidaan pDSY2:lla ja joko pTOC90:llä (WO 91/17243), joka kantaa

the *A. nidulans*'in *amdS*-geenin, tai *pSO2*:lla, joka kantaa *A. oryzae*'n *pyrG*-geenin.

5 Lakkaasin ekspressio havaitaan kaikissa testatuissa isännis-
sä, sekä *DSY1*:llä että *DSY2*:lla. Saannot ovat alueella 0,1 -
12,0 Δ abs/min/ml, havaiten korkeimmat saannot *A. niger*-kan-
noilla.

10 Tehdään *pDSY10*-konstrukti, joka sisältää TAKA-promoottorin,
lakkaasin täysimittaisen cDNA:n mukaan lukien sen oman sig-
naalisekvenssin, ja AMG-terminaattorin. 200 emäsparin Bam-
HI/AgeI-fragmentti, jossa on BamHI-kohta välittömästi 5'-
suuntaan aloituskodonin ATG:stä ja AgeI-kohta samassa ase-
massa kuin *pDSY1*:ssä, PCR-monistetaan käyttämällä *lacI*:tä
15 templaattina. MluI/HindIII-fragmentti PCR-monistetaan käyt-
tämällä *pDSY2*:ta templaattina, ja alkaa MluI-kohdalla, joka
on läsnä cDNA:ssa ja päättyy HindII-kohdalla suoraan 3'-
suuntaan lakkaasin lopetuskodonista. Edellä olevat kaksi
fragmenttia ja AgeI/MluI-fragmentti *pDSY2*:sta liitetään
20 *pHD414*:ään, jolloin saadaan *pDSY10* (kuvio 8).

Vektori *pHD414*, jota käytetään lakkaasin ekspressioon, on
plasmidin *p775* (EP 238 023) johdannainen. Vastakohtana tälle
plasmidille, *pHD414*:ssä on ainutlaatuisten restriktiokohtien
25 jakso TAKA-promoottorin ja AMG-terminaattorin välissä. Plas-
midi konstruoidaan poistamalla noin 200 emäsparia pitkän
fragmentin (sisältää ei-toivottavia RE-kohtia) terminaatto-
rin 3'-päässä, ja poistamalla seuraavaksi noin 250 emäsparia
pitkän fragmentin promoottorin 5'-päästä, joka myös sisältää
30 ei-toivottuja kohtia. 200 emäsparin alue poistetaan katkai-
semalla *NarI*:llä (sijaitsee *pUC*-vektorissa) ja *XbaI*:llä
(juuri 3'-suuntaan terminaattorista), täyttämällä muodostu-
neet päät seuraavaksi Klenow-DNA-polymeraasilla + dNTP:llä,
puhdistamalla vektorifragmentin geelillä, ja liittämällä
35 vektorifragmentin uudelleen. Tämä plasmidi saa nimen *pHD413*.
pHD413 katkaistaan *StuI*:llä (sijaitsee promoottorin 5'-pääs-
sä) ja *PvuII*:lla (*pUC*-vektorissa), fraktioidaan geelillä ja

liitetään uudelleen, jolloin saadaan tulokseksi pHD414. *A. oryzae* HowB104:n ja *A. niger* Bo-1:n kotransformointi tehdään käyttämällä pToC90:tä valintaan. Saannot ravistelupullossa ovat verrattavissa pDSY2:lla nähtyihin.

5

2. Ekspressio fermenttoreissa

1-ml:inen erä *Aspergillus niger*-transformantin Bo-1-pDSY10-4 itiösuspensiota (noin 10^9 itiötä/ml) lisätään aseptisesti 500-ml:iseen ravistelupulloon, joka sisältää 100 ml steriiliä ravistelupulloväliainetta (glukoosi, 75 g/l; soijajauho, 20 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l; KH_2PO_4 , 10 g/l; K_2SO_4 , 2 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l; sitruunahappo, 2 g/l; hiivauute, 10 g/l; hivenainemetalleja [$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14,3 g/l; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,5 g/l; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 13,8 g/l, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 8,5 g/l; sitruunahappo, 3,0 g/l], 0,5 ml/l; urea, 2 g/l, valmistettu vesijohtovedellä ja säädetty pH-arvoon 6,0 ennen autoklavointia), ja inkuboidaan 18 tunnin ajan 37 °C:ssa pyöri-
vällä ravistelijalla nopeudella 200 r/min. 50 ml tätä vil-
jelmää siirretään aseptisesti 3-l:iseen fermenttoriin, joka
sisältää 1,8 l fermenttoriväliainetta (maltodekstriini MD01
300 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l; KH_2PO_4 , 2 g/l; sitruunahappo 2
g/l; K_2SO_4 , 2,7 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l; hivenainemetalleja,
0,5 ml/l; pluronic-vaaktoamisenestoainetta, 1 ml/l; valmis-
tetaan vesijohtovedellä ja säädetään pH-arvoon 6,0 ennen
autoklavointia). Fermenttorin lämpötila pidetään 34 °C:ssa
kierrättämällä fermenttorivaipan läpi jäähdytysvettä. Fer-
menttorin läpi suihkutetaan steriiliä ilmaa nopeudella 1,8
l/min (1 tilavuus/tilavuus/m). Sekoitusnopeus pidetään ta-
solla 800 r/min ensimmäisten 24 tunnin ajan siirrostuksen
jälkeen, ja tasolla 1300 r/min fermentoinnin loppuajan.
Fermentoinnin pH-arvo pidetään happamalla tasolla 4,0 lisää-
mällä automaattisesti 5 N NaOH:ta tai H_3PO_4 :ää. Fermento-
riin lisätään steriiliä syöttöä (urea, 50 g/l; pluronic-
vaahdonestoaine, 1,5 ml/l, säädetty tislatusvedellä ja
autoklavoitu) peristaltista pumppua käyttämällä. Syöttöno-
peusprofiili fermentoinnin aikana on seuraava: 40 g syöttöä

lisätään aluksi ennen siirrostusta; siirrostuksen jälkeen, syöttö on vakionopeudella 2,5 g/tunti.

Kuparia valmistetaan 400X kantaliuokseksi veteen tai sopi-
 5 vaan puskuriin, steriilisuodatetaan, ja lisätään aseptisesti
 tankkiin lopulliselle tasolle 0,5 mM. Poistetaan näytteitä
 entsyymiaktiivisuusmäärittystä varten, ja suodatetaan "Mira-
 cloth"-vaatteen läpi myseelien poistamiseksi. Nämä näytteet
 määritetään lakkaasiaktiivisuuden suhteen LACU-määrittämisel-
 10 lä. Lakkaasiaktiivisuuden havaitaan kasvavan jatkuvasti
 fermentoinnin kuluessa, saavuttaen arvon noin 55 LACU/ml 190
 tunnin kuluttua. Tämä vastaa määrää noin 350 mg/l ekspres-
 söityä yhdistelmä-DNA-lakkaasia.

15 IV. Yhdistelmä-DNA-lakkaasin puhdistus

Materiaalit ja menetelmät

1. Materiaalit.

Puskureina ja substraatteina käytetyt kemikaalit ovat kau-
 pallisia tuotteita, jotka ovat ainakin reagenssilaatua.

20 Endo/N-glykosidaasi G on yhtiöstä Boehringer-Mannheim. Kro-
 matografia suoritetaan joko yhtiön Pharmacia FPLC:llä tai
 tavanomaisella avoinkolonnisella matalapainejärjestelmällä.
 Spektroskooppiset määritykset suoritetaan Shimadzu PC160-
 spektrofotometrillä.

25

2. Puhdistus

(a) DSY2

2,8 l juustovaatteella suodatettua kasvatuslientä (pH 7, 19
 mS), joka on saatu edellä kuvatusta *A. oryzae* pDSY2-trans-
 30 formantista, suodatetaan 0,45- μ m:isellä Corning-suodattimel-
 la, ja konsentroidaan Spiral Concentrator-konsentroitilait-
 teella (Amicon) S1Y30-membraanilla 200 ml:ksi. Tiivisteen
 pH-arvo säädetään tasolle 7,5, laimennetaan 4,8 l:lla vettä,
 jolloin saavutetaan konduktanssi 1,2 mS, ja konsentroidaan
 35 S1Y30:llä 200 ml:ksi. 50 ml tätä kasvatusliuosta lisätään Q-
 Sepharose-kolonniin (XK16, 34 ml geeliä), joka on esitasa-
 painotettu 10 mM Tris'illä, pH 7,5, 0,7 mS (puskuri A).

Sininen lakkaasivyöhyke, joka vaeltaa hitaasti panostuksen aikana, eluoidaan puskurin B (puskuri A plus 0,5 M NaCl) lineaarisella gradientilla. 24 ml yhdistettyjä lakkaasifraktioita konsentroidaan Centricon-100-laitteella (Amicon) 4,5 ml:ksi ja lisätään Superdex 200-kolonneihin (HiLoad 16/60, 120 ml geeliä). Puskurilla C (puskuri A plus 0,15 M NaCl, 14,4 mS) kehityksen aikana eluoituu sinisiä lakkaasifraktioita, joita seuraavat ruskehtavat kontaminanttifraktiot. Vain eluusiovyöhykkeen ensimmäisellä puoliskolla (havaittu Abs_{600} -arvolla) nähdään suuri lakkaasi/kontaminantti-suhde, ja ne yhdistetään. Yhdistetyt fraktiot dialysoidaan 10 mM Bis-Tris-puskurissa, pH 6,8, 0,6 mS (puskuri D), lisätään Mono-Q-kolonneihin (Mono-Q 5/5, 1 ml), joka on tasapainotettu puskurilla D, ja eluoidaan puskurilla E (puskuri D plus 0,5 M NaCl) lineaarista gradienttia käyttämällä. Lakkaasifraktiot, jotka tulevat ulos kohdalla noin 27 % puskuria E, ovat puhtaita SDS-PAGE:lla arvosteltuna. Lakkaasifraktiot tarkastetaan kussakin vaiheessa rutiininomaisesti ABTS-hapetuksella, SDS-PAGE:lla, ja "Western Blot"-määrityksellä.

20

(b) DSY10

2,8 l juustovaatteella suodatettua kasvatuslientä (pH 7,3, 24 mS), joka on saatu HowB104-pDSY10:stä, suodatetaan Whatman #2-paperilla, ja konsentroidaan Spiral Concentrator-laitteella (Amicon) S1Y100-membraanilla 210 ml:ksi. Tiivisteen pH laimennetaan vedellä, jolloin saadaan konduktanssi 1,2 mS, ja konsentroidaan S1Y100:lla 328 ml:aan. Tämä kasvatusliemi lisätään Q-Sepharose-kolonneihin (XK26, 120 ml geeliä), joka on esitasapainotettu 10 mM Tris'illä, pH 7,5, 0,7 mS (puskuri A). Sininen lakkaasivyöhyke, joka vaeltaa hitaasti panostuksen aikana, eluoidaan puskurin B (puskuri A plus 2 M NaCl) lineaarisella gradientilla. 120 ml yhdistettyjä lakkaasifraktioita laimennetaan vedellä, jolloin saavutetaan konduktanssi 1,1 mS, ja konsentroidaan sitten S1Y100:lla 294 ml:aan, ja lisätään Mono-Q-kolonneihin (HiLoad 16/10, 40 ml geeliä), joka on esitasapainotettu puskurilla A. Lakkaasi kulkee hitaasti kolonnin läpi panostuksen ja

puskurilla A pesun aikana. Yhdistetyt fraktiot, joiden pH-arvo on 5,6, lisätään Mono-Q-kolonniin (HiLoad 16/10, 40 ml geeliä), joka on esitasapainotettu puskurilla C (10 mM MES, pH 5,5, 0,1 mS). Lakkaasifraktiot eluoituvat puskurin D (puskuri C + 1 M NaCl) hyvin kapealla gradientilla. Entsy-

5 maattiset määritykset suoritetaan edellä kuvatulla tavalla.

3. Proteiininanalyysi

Suoritetaan kokonaisaminohappoanalyysi, N-terminaalinen

10 sekvensöinti, deglykosylointi, SDS-PAGE, IEF, ja western blots edellä kuvatulla tavalla.

B. Tulokset ja pohdinta

1. Puhdistus ja karakterisointi

15 DSY10:llä saavutetaan kaikenkaikkiaan 256-kertainen puhdistus ja saanto 37 %, ja DSY2:lla saavutetaan 246-kertainen puhdistus ja saanto 14 %. Puhdistettu DSY2 ja DSY10 ovat elektroforeettisen mallin, spektriominaisuuksien ja aktiivisuuden suhteen toisistaan eroamattomia. Puhdistetut yhdistelmä-DNA-lakkaasit käyttäytyvät dimeerinä geelisuodatuksessa, ja niiden alayksikön molekyylimassa on hieman villityyppilakkaasin alayksikön painoa suurempi, mikä viittaa *A. oryzae*'ssa tapahtuvaan translaation jälkeiseen käsittelyyn, josta on seurauksena ylimääräinen glykosylointi rekombinantteilla.

25 Deglykosylointi on varmistanut ylimääräisistä sokeista johtuvan massojen eron (Taulukko 3).

Taulukko 3. Yhdistelmä-DNA- ja villityyppilakkaasin molekyyli- ja spektriominaisuudet

30

	MW, kDa		Hiilihydraatti % paino/paino	pI	λ_{max} , nm (ϵ , l/g·cm)
	Natiivi	alayksikkö			
Villityyppi	~130	~63	~7	3,5	275 (1,8) 615 (0,12)
Yhdistelmä-DNA	~130	~67	~13	3,5	275 (1,7) 615 (0,11)

35

Puhdistettujen lakkaasien spektreillä on maksimit 615 nm ja 275, absorbanssin 275 nm:llä suhteella absorbanssiin 615 nm:llä ollessa 16, osoittaen yhden tyyppi-Cu:n alayksikköä kohden. Absorbanssin 330 nm:llä suhde absorbanssiin 615

nm:llä on 1,0, joka on lähellä *Rhus vernicefera*-lakkaasin arvoa 0,75, viitaten yhden tyyppi II- ja kahden tyyppi III-kupari-ionin läsnäoloon alayksikköä kohden. Aminohappoanalyysillä määritetty ekstinktiokerroin on 1,71/(g*cm).

5

3. Aktiivisuus

Lakkaasiaktiivisuus mitataan syringaldatsiini- ja ABTS-hapetuksella. Ilmaistuna A_{275} :n avulla lakkaasilla on LACU-arvo 83. Ilmaistuna mg:aa kohden sillä on LACU-arvo 141. Lakkaasin pH-profiili esitetään kuviossa 9.

10

V. Polyporus-lakkaasin käyttö hiusten värjäykseen

Polyporus pinsitus-lakkaasin värjäysteho testataan ja verrataan värjäystehtoon 3-%:isella H_2O_2 :lla erilaisilla väriprekursoreilla (luetellaan alla) ja edelleen 0,1-%:isella p-fenyleenidiamiinilla verrattuna joukkoon modifioijia.

15

Materiaalit:

Väriprekursorit:

- 20 0,1 % p-fenyleenidiamiinia 0,1 M K-fosfaattipuskurissa, pH 7,0. (pPD)
- 0,1 % p-tolyleenidiamiinia 0,1 M K-fosfaattipuskurissa, pH 7,0.
- 0,1 % kloori-p-fenyleenidiamiinia 0,1 M K-fosfaattipuskurissa, pH 7,0.
- 25 0,1 % p-aminofenolia 0,1 M K-fosfaattipuskurissa, pH 7,0.
- 0,1 % o-aminofenolia 0,1 M K-fosfaattipuskurissa, pH 7,0.
- 0,1 % 3,4-diaminotolueenia 0,1 M K-fosfaattipuskurissa, pH 7,0.

30

Modifioijat:

- 0,1 % m-fenyleenidiamiinia 0,1 M K-fosfaattipuskurissa, pH 7,0.
- 0,1 % 2,4-diaminoanisolia 0,1 M K-fosfaattipuskurissa, pH 7,0.
- 35 0,1 % α -naftolia 0,1 M K-fosfaattipuskurissa, pH 7,0.
- 0,1 % hydrokinonia 0,1 M K-fosfaattipuskurissa, pH 7,0.

0,1 % pyrokatekolia 0,1 M K-fosfaattipuskurissa, pH 7,0.

0,1 % resorsinolia 0,1 M K-fosfaattipuskurissa, pH 7,0.

0,1 % 4-klooriresorsinolia 0,1 M K-fosfaattipuskurissa, pH 7,0.

5

Modifioijaa käytettäessä väriprekursori p-fenyleenidiamiini yhdistetään yhden edellä mainituista modifioijista kanssa niin, että lopullinen konsentraatio värjäysliuoksessa on 0,1 % suhteessa prekursoriin ja 0,1 % suhteessa modifioijaan.

10 Käytetty entsyymi on yhdistelmä-DNA-lakkaasia Polyporus pinisitus'ista, konsentraatiossa 10 LACU/ml.

Muita menetelmässä käytettyjä liuoksia ovat 3-% H_2O_2 (lopullisessa väriliuoksessa), ja kaupallinen shampoo.

15

Hiuskiehkuroiden kvantitatiivinen väri määritetään Datascolor Textflash 2000-laitteella (CIE-Lab) käyttäen CIE-Lab-parametrejä L^* (" 0 "= musta ja " 100 " = valkoinen) yhdistettynä arvon a^* (" $-$ " = vihreä ja " $+$ "= punainen) kanssa. DL^* ja Da^* ovat näytteen arvojen L^* ja a^* Δ -arvoja, vastaavasti, verrattaessa käsittelemättömien hiusten arvoihin L^* ja a^* . Valonkestävyys määritetään päivänvalohehkulampulla (D65) valaistusvoimakkuudella 1000 lx.

25 Käytetään vaalean eurooppalaisen hiuksen kiehkuroita (1 g).
4 ml väriprekursoriliuosta (joka sisältää modifioijaa) sekoitetaan 1 ml:n kanssa lakkaasia tai 1 ml:n kanssa H_2O_2 :ta Whirley-sekoittimella, lisätään hiuskiehkuroihin, ja pidetään 60 min ajan 30 °C:ssa. Sitten hiuskiehkurat huuhdotaan
30 juoksevalle vedelle, kammataan, ja kuivataan ilmassa.

Värjäystehotestin tulokset esitetään alla taulukossa 4 - 6 ja edelleen kaavioissa kuvioissa 10 - 12.

35

Taulukko 4

Näyte n:o	Näyte ID	L*	a*	DL*	Da*
	käsittelemättömät vaaleat hiukset	72,25	2,42		
1	p-fenyleenidiamiini (Vertailu)	62,85	4,03	-9,41	1,61
2	p-fenyleenidiamiini + Lakkaasi	28,70	0,33	-43,56	-2,10
3	p-fenyleenidiamiini + 3 % H ₂ O ₂	21,88	2,04	-50,37	-0,39
4	p-toluyleenidiamiini (Vertailu)	58,14	4,34	-14,11	1,92
5	p-toluyleenidiamiini + Lakkaasi	36,70	8,09	-35,56	5,67
6	p-toluyleenidiamiini + 3 % H ₂ O ₂	42,30	6,24	-29,95	3,81
7	kloori-p-fenyleenidiamiini (Vertailu)	69,82	3,23	-2,43	0,81
8	kloori-p-fenyleenidiamiini + Lakkaasi	35,58	9,36	-36,68	6,93
9	kloori-p-fenyleenidiamiini + 3 % H ₂ O ₂	45,42	9,59	-26,84	7,17
10	p-aminofenoli (Vertailu)	66,62	5,03	-5,63	2,61
11	p-aminofenoli + Lakkaasi	42,42	7,38	-29,84	4,95
12	p-aminofenoli + 3 % H ₂ O ₂	50,54	9,42	-21,72	7,26
13	o-aminofenoli (Vertailu)	69,39	4,82	-2,89	2,39
14	o-aminofenoli + Lakkaasi	60,20	12,92	-12,05	10,50
15	o-aminofenoli + 3 % H ₂ O ₂	63,49	10,38	-8,77	7,96
16	3,4-diaminotolueeni (Vertailu)	69,62	3,57	-2,63	1,15
17	3,4-diaminotolueeni + Lakkaasi	39,51	3,15	-32,74	0,73
18	3,4-diaminotolueeni + 3 % H ₂ O ₂	59,32	4,16	-12,94	1,74

L*: 0 = musta, 100 = valkoinen a*: - = vihreä, + = punainen

Taulukko 5

Näyte n:o	Näyte ID	L*	a*	DL*	Da*
	Käsittelemättömät vaaleat hiukset	72,25	2,42		
19	p-fenyleenidiamiini+ m-fenyleenidiamiini (Vertailu)	58,82	0,43	-13,44	-1,99
20	p-fenyleenidiamiini + m-fenyleenidiamiini + Lakkaasi	27,20	0,83	-45,05	-1,59
21	p-fenyleenidiamiini + m-fenyleenidiamiini + 3 % H ₂ O ₂	16,96	0,13	-55,29	-2,59
22	p-fenyleenidiamiini + 2,4 diaminoanisoli (Vertailu)	35,37	-0,02	-36,89	-2,45
23	p-fenyleenidiamiini + 2,4-diaminoanisoli + Lakkaasi	24,56	2,99	-47,70	0,57
24	p-fenyleenidiamiini + 2,4-diaminoanisoli + 3 % H ₂ O ₂	15,06	2,21	-57,20	-0,21
25	p-fenyleenidiamiini + α-naftoli (Vertailu)	54,33	2,54	-17,93	0,12
26	p-fenyleenidiamiini + α-naftoli + Lakkaasi	29,53	4,03	-42,72	1,60
27	p-fenyleenidiamiini + α-naftoli + 3 % H ₂ O ₂	19,58	3,90	-52,68	1,47
28	p-fenyleenidiamiini + hydrokinoni (Vertailu)	53,25	4,08	-19,01	1,65
29	p-fenyleenidiamiini + hydrokinoni + Lakkaasi	40,48	5,00	-31,77	2,58
30	p-fenyleenidiamiini + hydrokinoni + 3 % H ₂ O ₂	29,06	4,96	-43,20	2,53

L*: 0 = musta, 100 = valkoinen a*: - = vihreä, + = punainen

Taulukko 6

Näyte n:o	Näyte ID	L*	a*	DL*	Da*
	Käsittelemättömät vaaleat hiukset	72,25	2,42		
31	p-fenyleenidiamiini + pyrokatekoli (Vertailu)	53,78	1,68	-18,47	-0,74
32	p-fenyleenidiamiini + pyrokatekoli + Lakkaasi	30,77	2,64	-41,49	0,22
33	p-fenyleenidiamiini + pyrokatekoli + 3 % H ₂ O ₂	22,15	3,30	-50,11	0,88
34	p-fenyleenidiamiini + resorsinoli (Vertailu)	62,12	4,23	-10,14	1,81
35	p-fenyleenidiamiini + resorsinoli + Lakkaasi	36,14	2,91	-36,11	0,49
36	p-fenyleenidiamiini + resorsinoli + 3 % H ₂ O ₂	23,94	3,16	-48,31	0,74
40	p-fenyleenidiamiini + 4-klooriresorsinoli (Vertailu)	61,18	4,70	-11,07	2,28
41	p-fenyleenidiamiini + 4-klooriresorsinoli + Lakkaasi	36,00	2,76	-36,26	0,34
42	p-fenyleenidiamiini + 4-klooriresorsinoli + 3 % H ₂ O ₂	22,63	2,60	-49,63	0,18

L*: 0 = musta, 100 = valkoinen a*: - = vihreä, + = punainen

Hapettava hiustenvärjäys suoritetaan edellä kuvatulla tavalla paitsi, että käytetään 50 LACU/ml Polyporus pinsitus-lakkaasia.

- 5 Pesunkestävyyden testaamiseksi värjätyt hiuskiehkurat kostutetaan ja pestään 15 s ajan 50 μ l:lla kaupallista shampoota, ja huuhdotaan vedellä 1 min ajan. Hiuskiehkurat pestään jopa 20 kertaa.
- 10 Hiustenpesutestin tulokset esitetään kuviossa 13. Kuvioista 13 voidaan nähdä, että jopa 20 kertaa pestyjen hiusten pesunkestävyys on erinomainen, käytettäessä Polyporus pinsitus-lakkaasia hapettavaan värjäykseen.
- 15 Valonkestävyyden testaamiseksi, käytetään vaaleita eurooppalaisia hiuksia Polyporus pinsitus-lakkaasia käyttäen värjättyjen hiusten valonkestävyyden testaamiseksi verrattuna hiuksiin, jotka on värjätty H_2O_2 :ta käyttämällä. p-fenyleenidiamiini on väriprekursori. Hiusten värjäys suoritetaan edellä kuvatulla tavalla. Yhtä hiuskiehkuraa pidetään pimeässä, kun taas toista pidetään päivänvalossa (ts. päivänvaloherkkulampun (D65) alla), tasolla noin 1000 lx) jopa 275 tunnin ajan. CIE-Lab-arvot määritetään välittömästi hiustren värjäyksen jälkeen, ja edelleen päivänvalolle altistamisen aikana.
- 25

Testin tulokset esitetään kuviossa 14. Kuviossa 14 esitetään, että hiuksilla, jotka on värjätty p-fenyleenidiaminilla käyttäen Polyporus pinsitus-lakkaasia on sama valonkestävyys, kuin hiuksilla, jotka on värjätty H_2O_2 :ta käyttäen.

Biologisten materiaalien talletus
Seuraavat biologiset materiaalit on talletettu kansainvälisen Budapestin sopimuksen mukaan laitokseen the Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria,

35

Illinois, 61604, 25. toukokuuta 1994, ja seuraavilla tulo-
numeroilla.

	Talletus	Tulonumero
	E. coli DH5 α , joka sisältää	NRRL B-21263
5	pDSY22:n (41GEN; ~3,0 ke:n EcoRI-insertti)	
	E. coli DH5 α , joka sisältää	NRRL B-21268
	pDSY23:n (41GEN; ~4,5 ke:n MluI-insertti; insertti sisältää pDSY22:n EcoRI-fragmentin pienen osan ja sekvenssit 5'-suuntaan	
10	EcoRI-fragmentista)	
	E. coli XL-1 Blue, joka sisältää	NRRL B-21264
	pDSY21:n (31GEN; -7,7 ke:n EcoRI/BamHI-insertti)	
	E. coli XL-1 Blue, joka sisältää	NRRL B-21265
	pDSY18:n (21GEN; ~8,0 ke:n BamHI-insertti)	
15	E. coli DH5 α , joka sisältää	NRRL B-21266
	pDSY19:n (23GEN; ~4 ke:n HindIII-insertti)	
	E. coli DH5 α , joka sisältää	NRRL B-21267
	pDSY20:n (24GEN; ~8,5 ke:n EcoRI-insertti)	

SEKVENSSILUETTELO

(1) YLEISET TIEDOT:

(i) HAKIJA:

- (A) NIMI: Novo Nordisk Biotech, Inc.
- (B) KATU: 1445 Drew Avenue
- (C) KAUPUNKI: Davis, California
- (D) MAA: USA
- (E) POSTINUMERO (ZIP): 95616-4880
- (F) PUHELIN: (916) 757-8100
- (G) TELEFAX: (916) 758-0317

(i) HAKIJA:

- (A) NIMI: Novo Nordisk A/S
- (B) KATU: Novo Alle
- (C) KAUPUNKI: Bagsværd
- (D) MAA: Tanska
- (E) POSTINUMERO (ZIP): DK-2880
- (F) PUHELIN: +45 4444 8888
- (G) TELEFAX: +45 4449 3256
- (F) TELEX: 37304

- (ii) KEKSINNÖN NIMITYS: PUHDISTETUT POLYPORUS-LAKKAA-SIT, JA NIITÄ KOODITTAVAT NUKLEIINIhapot

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 10

(iv) KIRJEENVAIHTO-OSOITE:

- (A) VASTAANOTTAJA: Novo Nordisk of North America, Inc.
- (B) KATU: 405 Lexington Avenue, Suite 6400
- (C) KAUPUNKI ja OSAVALTIO: New York, New York
- (D) MAA: USA
- (E) POSTINUMERO: 10174-6401

(v) KONEKOODIMUOTO:

- (A) VÄLINETYYPPI: disketti
- (B) TIETOKONE: IBM PC-yhteensopiva
- (C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
- (D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(vi) NYKYISEN HAKEMUKSEN TIEDOT:

- (A) HAKEMUSNUMERO: annettava
- (B) JÄTTÖPÄIVÄ: 15. kesäkuuta 1995

(vii) ETUOIKEUSHAKEMUKSEN TIEDOT:

- (A) HAKEMUSNUMERO: 08/265,534
- (B) JÄTTÖPÄIVÄ: 24. kesäkuuta 1994

- (viii) ASIAMIEHEN TIEDOT:
 - (A) NIMI: Lowney, Karen A.
 - (B) REKISTERINUMERO: 31,274
 - (C) VIITE/LUETTELONUMERO: 4185.204-WO

- (ix) TIETOLIIKENNEYHTEYSTIEDOT:
 - (A) PUHELIN: 212 867 0123
 - (B) TELEFAX: 212 878 9655

(2) SEKVENSSIN ID NO:1 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 - (A) PITUUS: 2418 emäsparia
 - (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 - (C) JUOSTEISUUS: kaksijuosteinen
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (perimän)
- (vi) ALKUPERÄ:
 - (A) ORGANISMI: Polyporus pinsitus
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINTI: 414..464
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINTI: 534..589
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINTI: 710..764
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINTI: 879..934
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINTI: 1001..1050
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINTI: 1147..1197
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINTI: 1354..1410
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINTI: 1609..1662
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: CDS

(B) SIJAINTI:

liitos (413..465, 533..590, 709..765, 878..935,
1000..1051, 1146..1198, 1353..1411, 1608..1663)

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:1:

```

AGATTCTGA CACCGGTGCA ATCTTGACAC TGTACCAACC GGGCAAGTCT CGTCCTTGGT      60
TCTCGGGGACT GGCGCCGGT CGCTACCCCT TGGTCATTCA CTCTACCAGA GCGCTGGCTT      120
CGCCGAGGTA TAAAGGATGT TGC GCGACAC CCTCAACACC CCAACTCAAG CCCCACTTGA      180
GCTTTTGC GA GATCCTCCAC ATACCACTCA CTACTTTCAA GTTCTTCAAC ATG TCG AGG      239
                                   Met Ser Arg
                                   1

TTT CAC TCT CTT CTC GCT TTC GTC GTT GCT TCC CTT ACG GCT GTG GCC      287
Phe His Ser Leu Leu Ala Phe Val Val Ala Ser Leu Thr Ala Val Ala
  5                      10                      15

CAC GCT GGT ATC GGT CCC GTC GCC GAC CTA ACC ATC ACC AAC GCA GCG      335
His Ala Gly Ile Gly Pro Val Ala Asp Leu Thr Ile Thr Asn Ala Ala
 20                      25                      30                      35

GTC AGC CCC GAC GGG TTT TCT CGC CAG GCC GTC GTC GTG AAC GGC GGC      383
Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser Arg Gln Ala Val Val Val Asn Gly Gly
                   35                      40                      45

ACC CCT GGC CCT CTC ATC ACG GGT AAC ATG GTTCGTCTCG GCTCGCACTA      433
Thr Pro Gly Pro Leu Ile Thr Gly Asn Met
                   50                      55

GGGGGTTGTA TCGTTCCTGA CGTTGTTGGA G GGG GAT CGC TTC CAG CTC AAT GTC ATC      491
                                   Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile
                                   60                      65

GAC AAC CTT ACC AAC CAC ACG ATG GTG AAG AGC ACG AGT ATT GTGAGCTGCT      543
Asp Asn Leu Thr Asn His Thr Met Val Lys Ser Thr Ser Ile
                   70                      75

ATTCTCCGG ACGGGGCTTC ATTGTGCTAA TAATCGTCGT GTGCAG CAC TGG CAC GGT      601
                                   His Trp His Gly
                                   80

TTC TTC CAG AAG GGT ACC AAC TGG GCC GAC GGT CCC GCC TTC ATC AAC      649
Phe Phe Gln Lys Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Ile Asn
  85                      90                      95

CAG TGC CCG ATC TCA TCT GGT CAC TCG TTC CTG TAC GAC TTC CAG GTT      697
Gln Cys Pro Ile Ser Ser Gly His Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val
 100                      105                      110                      115

CCT GAC CAG GCT GTAAGTACGG TCGTTATGGA GTATACTGCG CATTGCTAAA      749
Pro Asp Gln Ala

CCACATGGTG AACAG GGT ACC TTC TGG TAT CAC AGT CAC TTG TCT ACG CAG      800
                                   Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln
                                   120                      125                      130

TAC TGT GAT GGT TTG AGG GGT CCG TTC GTT GTT TAC GAC CCG AAT GAC      848
Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro Phe Val Val Tyr Asp Pro Asn Asp
 135                      140                      145

CCG GCC GCC GAC CTG TAC GAC GTC GAC AAC GTAAGGACGA ATTCGAACCG      898
Pro Ala Ala Asp Leu Tyr Asp Val Asp Asn
 150                      155

TAAATACTTG CTTACTGATA CTTCTCGATG AATTAG GAC GAC ACT GTC ATT      949

```

ACC CTT GTG GAT TGG TAC CAC GTC GCC GCG AAG CTG GGC CCC GCA TTC	997
Thr Leu Val Asp Trp Tyr His Val Ala Ala Lys Leu Gly Pro Ala Phe	
165 170 175	
CCT GTAAGTCCAT GAGTATTCTG CTGTTGAATC TGTCTTAACT GTGCATATCA CTC	1053
Pro Leu 180	
GGC GCC GAC GCC ACC CTC ATC AAC GGT AAG GGA CGC TCC CCC AGC ACG	1101
Gly Ala Asp Ala Thr Leu Ile Asn Gly Lys Gly Arg Ser Pro Ser Thr	
185 190 195	
ACC ACC GCG GAC CTC TCA GTT ATC AGC GTC ACC CCG GGT AAA CGC	1146
Thr Thr Ala Asp Leu Ser Val Ile Ser Val Thr Pro Gly Lys Arg	
200 205 210	
GTATGCTATA TCTTATCTTA TCTGATGGCA TTTCTCTGAG ACATTCTCCA G	1197
TAC CGT TTC CGC CTG GTG TCC CTG TCG TGC GAC CCC AAC TAC ACG TTC	1245
Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Leu Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe	
215 220 225	
AGC ATC GAT GGT CAC AAC ATG ACG ATC ATC GAG ACC GAC TCA ATC AAC	1293
Ser Ile Asp Gly His Asn Met Thr Ile Ile Glu Thr Asp Ser Ile Asn	
230 235 240	
ACG GCG CCC CTC GTC GTC GAC TCC ATT CAG ATC TTC GCC GCC CAG CGT	1341
Thr Ala Pro Leu Val Val Asp Ser Ile Gln Ile Phe Ala Ala Gln Arg	
245 250 255	
TAC TCC TTC GTG GTAAGTTCGA TTCATCCTCT AACGTTGGTC GCTGTTAGTG	1393
Tyr Ser Phe Val	
260	
ATCGTATGGT CATGTAG CTC GAG GCC AAC CAG GCC GTC GAC AAC TAC TGG	1443
Leu Glu Ala Asn Gln Ala Val Asp Asn Tyr Trp	
265 270	
ATT CGC GCC AAC CCG AAC TTC GGT AAC GTC GGG TTC ACC GGC GGC ATT	1491
Ile Arg Ala Asn Pro Asn Phe Gly Asn Val Gly Phe Thr Gly Gly Ile	
275 280 285 290	
AAC TCG GCT ATC CTC CGC TAC GAT GGT GCC GCT GCC GTG GAG CCC ACC	1539
Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Asp Gly Ala Ala Ala Val Glu Pro Thr	
295 300 305	
ACA ACG CAA ACC ACG TCG ACT GCG CCG CTC AAC GAG GTC AAC CTG CAC	1587
Thr Thr Gln Thr Thr Ser Thr Ala Pro Leu Asn Glu Val Asn Leu His	
310 315 320	
CCG CTG GTT ACC ACC GCT GTG GTATGTAATA TTGTCGGTAA TGTAATACAT	1638
Pro Leu Val Thr Thr Ala Val	
325	
TGTTGCTGAC CTCGACCCCC ACAG CCT GGC TCG CCC GTC GCT GGT GGT GTC	1689
Pro Gly Ser Pro Val Ala Gly Gly Val	
330 335	
GAC CTG GCC ATC AAC ATG GCG TTC AAC TTC AAC GGC ACC AAC TTC TTC	1737
Asp Leu Ala Ile Asn Met Ala Phe Asn Phe Asn Gly Thr Asn Phe Phe	
340 345 350	
ATC AAC GGC ACG TCT TTC ACG CCC CCG ACC GTG CCT GTC CTG CTC CAG	1785
Ile Asn Gly Thr Ser Phe Thr Pro Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln	
355 360 365 370	
ATC ATC AGC GGC GCG CAG AAC GCG CAG GAC CTC CTG CCC TCC GGT AGC	1833

Ile	Ile	Ser	Gly	Ala	Gln	Asn	Ala	Gln	Asp	Leu	Leu	Pro	Ser	Gly	Ser	
				375					380					385		
GTC	TAC	TCG	CTT	CCC	TCG	AAC	GCC	GAC	ATC	GAG	ATC	TCC	TTC	CCC	GCC	1881
Val	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ser	Asn	Ala	Asp	Ile	Glu	Ile	Ser	Phe	Pro	Ala	
			390					395					400			
ACC	GCC	GCC	GCC	CCC	GGT	GCG	CCC	CAC	CCC	TTC	CAC	TTG	CAC	GGG	CAC	1929
Thr	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	His	Pro	Phe	His	Leu	His	Gly	His	
			405				410					415				
GCG	TTC	GCG	GTC	GTC	CGC	AGC	GCC	GGC	AGC	ACG	GTT	TAC	AAC	TAC	GAC	1977
Ala	Phe	Ala	Val	Val	Arg	Ser	Ala	Gly	Ser	Thr	Val	Tyr	Asn	Tyr	Asp	
	420					425					430					
AAC	CCC	ATC	TTC	CGC	GAC	GTC	GTC	AGC	ACG	GGG	ACG	CCT	GCG	GCC	GGT	2025
Asn	Pro	Ile	Phe	Arg	Asp	Val	Val	Ser	Thr	Gly	Thr	Pro	Ala	Ala	Gly	
435					440					445					450	
GAC	AAC	GTC	ACC	ATC	CGC	TTC	CGC	ACC	GAC	AAC	CCC	GGC	CCG	TGG	TTC	2073
Asp	Asn	Val	Thr	Ile	Arg	Phe	Arg	Thr	Asp	Asn	Pro	Gly	Pro	Trp	Phe	
				455					460					465		
CTC	CAC	TGC	CAC	ATC	GAC	TTC	CAC	CTC	GAG	GCC	GGC	TTC	GCC	GTC	GTG	2121
Leu	His	Cys	His	Ile	Asp	Phe	His	Leu	Glu	Ala	Gly	Phe	Ala	Val	Val	
			470					475					480			
TTC	GCG	GAG	GAC	ATC	CCC	GAC	GTC	GCG	TCG	GCG	AAC	CCC	GTC	CCC	CAG	2169
Phe	Ala	Glu	Asp	Ile	Pro	Asp	Val	Ala	Ser	Ala	Asn	Pro	Val	Pro	Gln	
		485					490					495				
GCG	TGG	TCC	GAC	CTC	TGT	CCG	ACC	TAC	GAC	GCG	CTC	GAC	CCG	AGC	GAC	2217
Ala	Trp	Ser	Asp	Leu	Cys	Pro	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	Asp	Pro	Ser	Asp	
	500					505					510					
CAG	TAAATGGCTT	GCGCCGGTCG	ATGATAGGAT	ATGGACGGTG	AGTTCGCACT											2270
Gln																
515																
TGCAATACGG	ACTCTCGCCT	CATTATGGTT	ACACACTCGC	TCTGGATCTC	TCGCCTGTCTG											2330
ACAGAACAAA	CTTGTATAAT	TCGCTTAATG	GTTGAAACAA	ATGGAATATT	GGGGTACTAT											2390
GCACGCATCT	CGCTGGGTGA	GCTTTCGT														2418

(2) SEKVENSSIN ID NO:2 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 520 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(vi) ALKUPERÄ:

- (A) ORGANISMI: Polyporus pinsitus

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:2:

Ala Val Ala His Ala Gly Ile Gly Pro Val Ala Asp Leu Thr Ile Thr
 20 25 30
 Asn Ala Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser Arg Gln Ala Val Val Val
 35 40 45
 Asn Gly Gly Thr Pro Gly Pro Leu Ile Thr Gly Asn Met Gly Asp Arg
 50 55 60
 Phe Gln Leu Asn Val Ile Asp Asn Leu Thr Asn His Thr Met Val Lys
 65 70 75 80
 Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe Gln Lys Gly Thr Asn Trp
 85 90 95
 Ala Asp Gly Pro Ala Phe Ile Asn Gln Cys Pro Ile Ser Ser Gly His
 100 105 110
 Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp Gln Ala Gly Thr Phe Trp
 115 120 125
 Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro
 130 135 140
 Phe Val Val Tyr Asp Pro Asn Asp Pro Ala Ala Asp Leu Tyr Asp Val
 145 150 155 160
 Asp Asn Asp Asp Thr Val Ile Thr Leu Val Asp Trp Tyr His Val Ala
 165 170 175
 Ala Lys Leu Gly Pro Ala Phe Pro Leu Gly Ala Asp Ala Thr Leu Ile
 180 185 190
 Asn Gly Lys Gly Arg Ser Pro Ser Thr Thr Thr Ala Asp Leu Ser Val
 195 200 205
 Ile Ser Val Thr Pro Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Leu
 210 215 220
 Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp Gly His Asn Met Thr
 225 230 235 240
 Ile Ile Glu Thr Asp Ser Ile Asn Thr Ala Pro Leu Val Val Asp Ser
 245 250 255
 Ile Gln Ile Phe Ala Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val Leu Glu Ala Asn
 260 265 270
 Gln Ala Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Asn Pro Asn Phe Gly Asn
 275 280 285
 Val Gly Phe Thr Gly Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Asp Gly
 290 295 300
 Ala Ala Ala Val Glu Pro Thr Thr Thr Gln Thr Thr Ser Thr Ala Pro
 305 310 315 320
 Leu Asn Glu Val Asn Leu His Pro Leu Val Thr Thr Ala Val Pro Gly
 325 330 335
 Ser Pro Val Ala Gly Gly Val Asp Leu Ala Ile Asn Met Ala Phe Asn
 340 345 350
 Phe Asn Gly Thr Asn Phe Phe Ile Asn Gly Thr Ser Phe Thr Pro Pro
 355 360 365
 Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Ile Ser Gly Ala Gln Asn Ala Gln
 370 375 380
 Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Val Tyr Ser Leu Pro Ser Asn Ala Asp
 385 390 395 400
 Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ala Thr Ala Ala Ala Pro Gly Ala Pro His
 405 410 415
 Pro Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly
 420 425 430
 Ser Thr Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser
 435 440 445
 Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Arg Thr
 450 455 460
 Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu
 465 470 475 480
 Glu Ala Gly Phe Ala Val Val Phe Ala Glu Asp Ile Pro Asp Val Ala
 485 490 495
 Ser Ala Asn Pro Val Pro Gln Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Thr Tyr
 500 505 510

Asp Ala Leu Asp Pro Ser Asp Gln
515 520

(2) SEKVENSSIN ID NO:3 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 - (A) PITUUS: 2880 emäsparia
 - (B) TYPPI: nukleiinihappo
 - (C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINNI: 544..592
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINNI: 837..899
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINNI: 1014..1066
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINNI: 1133..1187
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINNI: 1284..1342
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINNI: 1752..1815
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINNI: 1873..1928
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINNI: 2136..2195
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: CDS
 - (B) SIJAINNI:
 - liitos(364..543, 593..661, 716..835, 900..1013,
 - 1067..1132, 1188..1283, 1343..1498, 1554..1751,
 - 1816..1872, 1929..2135, 2196..2489)
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINNI: 662..715

(ix) OMINAISPIIRRE:

(A) NIMI/SELITYS: introni

(B) SIJAINI: 1499..1553

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:3:

GCGGCGCACA AACCGTGGGA GCCAACACAC TCCCGTCCAC TCTCACACTG GCCAGATTCG	60
CGCGACCGCC GCCTTTTCAGG CCCAAACAGA TCTGGCAGGT TTCGATGGCG CACGCCGCCG	120
TGCCTGCCGG ATTCAATTGT GCGCCAGTCG GGCATCCGGA TGGCTCTACC AGCGCGGTTG	180
ACTGGAAGAG AACACCGAGG TCATGCATTC TGGCCAAGTG CGGCCAAAGG ACCGCTCGCT	240
GGTGCGGATA CTTAAAGGGC GCGCGGGGGA GGCCTGTCTA CCAAGCTCAA GCTCGCCTTG	300
GGTTCCTCAGT CTCCGCCACC CTCCTCTTCC CCCACACAGT CGCTCCATAG CACCGTCGGC	360
GCC ATG GGT CTG CAG CGA TTC AGC TTC TTC GTC ACC CTC GCG CTC GTC Met Gly Leu Gln Arg Phe Ser Phe Phe Val Thr Leu Ala Leu Val 1 5 10 15	408
GCT CGC TCT CTT GCA GCC ATC GGG CCG GTG GCG AGC CTC GTC GTC GCG Ala Arg Ser Leu Ala Ala Ile Gly Pro Val Ala Ser Leu Val Val Ala 20 25 30	456
AAC GCC CCC GTC TCG CCC GAC GGC TTC CTT CGG GAT GCC ATC GTG GTC Asn Ala Pro Val Ser Pro Asp Gly Phe Leu Arg Asp Ala Ile Val Val 35 40 45	504
AAC GGC GTG GTC CCT TCC CCG CTC ATC ACC GGG AAG AAG GTCGGCGTGT Asn Gly Val Val Pro Ser Pro Leu Ile Thr Gly Lys Lys 50 55 60	553
TCGTCGTCGT CCTACTCCTT TGCTGACAGC GATCTACAG GGA GAC CGC TTC CAG Gly Asp Arg Phe Gln 65	607
CTC AAC GTC GTC GAC ACC TTG ACC AAC CAC AGC ATG CTC AAG TCC ACT Leu Asn Val Val Asp Thr Leu Thr Asn His Ser Met Leu Lys Ser Thr 70 75 80	655
AGT ATC GTAAGTGTGA CGATCCGAAT GTGACATCAA TCGGGGCTAA TTAACCGCGC Ser Ile	711
ACAG CAC TGG CAC GGC TTC TTC CAG GCA GGC ACC AAC TGG GCA GAA GGA His Trp His Gly Phe Phe Gln Ala Gly Thr Asn Trp Ala Glu Gly 85 90 95	760
CCC GCG TTC GTC AAC CAG TGC CCT ATT GCT TCC GGG CAT TCA TTC CTG Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys Pro Ile Ala Ser Gly His Ser Phe Leu 100 105 110	808
TAC GAC TTC CAT GTG CCC GAC CAG GCA GTAAGCAGGA TTTTCTGGGG Tyr Asp Phe His Val Pro Asp Gln Ala 115 120	855
TCCCCGTGTG ATGCAATGTT CTCATGCTCC GACGTGATCG ACAG GGG ACG TTC TGG Gly Thr Phe Trp 125	911
TAC CAC AGT CAT CTG TCT ACG CAG TAC TGT GAC GGG CTG CGG GGG CCG Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro 130 135 140	959

TTC GTC GTG TAC GAC CCC AAG GAC CCG CAC GCC AGC CGT TAC GAT GTT Phe Val Val Tyr Asp Pro Lys Asp Pro His Ala Ser Arg Tyr Asp Val 145 150 155	1007
GAC AAT GTACGTGCGC CACGGAGTAT ATCACACAGC ATGCGTTGAC GTCGGGCCAA Asp Asn 160	1063
CAG GAG AGC ACG GTC ATC ACG TTG ACC GAC TGG TAC CAC ACC GCT GCC Glu Ser Thr Val Ile Thr Leu Thr Asp Trp Tyr His Thr Ala Ala 165 170 175	1111
CGG CTC GGT CCC AAG TTC CCA GTAAGCTCGC AATGGCTTAG TGTTCACAGG Arg Leu Gly Pro Lys Phe Pro 180	1162
TTCTTTGCTT ATGTTGCTTC GATAG CTC GGC GCG GAC GCC ACG CTC ATC AAC Leu Gly Ala Asp Ala Thr Leu Ile Asn 185 190	1214
GGT CTG GGG CGG TCG GCC TCG ACT CCC ACC GCT GCG CTT GCC GTG ATC Gly Leu Gly Arg Ser Ala Ser Thr Pro Thr Ala Ala Leu Ala Val Ile 195 200 205	1262
AAC GTC CAG CAC GGA AAG CGC GTGAGCATTC TCTTGATGC CATTTCAATG Asn Val Gln His Gly Lys Arg 210 215	1313
CTTTGTGCTG ACCTATCGGA ACCGCGCAG TAC CGC TTC CGT CTC GTT TCG ATC Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Ile 220	1366
TCG TGT GAC CCG AAC TAC ACG TTC AGC ATC GAC GGG CAC AAC CTG ACC Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp Gly His Asn Leu Thr 225 230 235	1414
GTC ATC GAG GTC GAC GGC ATC AAT AGC CAG CCT CTC CTT GTC GAC TCT Val Ile Glu Val Asp Gly Ile Asn Ser Gln Pro Leu Leu Val Asp Ser 240 245 250 255	1462
ATC CAG ATC TTC GCC GCA CAG CGC TAC TCC TTC GTG GTAAGTCCTG Ile Gln Ile Phe Ala Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val 260 265	1508
GCTTGTCGAT GCTCCAAAGT GGCCTCACTC ATATACTTTC GTTAG TTG AAT GCG Leu Asn Ala 270	1562
AAT CAA ACG GTG GGC AAC TAC TGG GTT CGT GCG AAC CCG AAC TTC GGA Asn Gln Thr Val Gly Asn Tyr Trp Val Arg Ala Asn Pro Asn Phe Gly 275 280 285	1610
ACG GTT GGG TTC GCC GGG GGG ATC AAC TCC GCC ATC TTG CGC TAC CAG Thr Val Gly Phe Ala Gly Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Gln 290 295 300	1658
GGC GCA CCG GTC GCC GAG CCT ACC ACG ACC CAG ACG CCG TCG GTG ATC Gly Ala Pro Val Ala Glu Pro Thr Thr Thr Gln Thr Pro Ser Val Ile 305 310 315	1706
CCG CTC ATC GAG ACG AAC TTG CAC CCG CTC GCG CGC ATG CCA GTG Pro Leu Ile Glu Thr Asn Leu His Pro Leu Ala Arg Met Pro Val 320 325 330	1751
GTATGTCTCT TTTTCTGATC ATCTGAGTTG CCCGTTGTTG ACCGCATTAT GTGTTACTAT	1811
CTAG CCT GGC AGC CCG ACA CCC GGG GGC GTC GAC AAG GCG CTC AAC CTC Pro Gly Ser Pro Thr Pro Gly Gly Val Asp Lys Ala Leu Asn Leu 335 340 345	1860

GCG TTT AAC TTC GTAAGTATCT CTACTACTTA GGCTGGAGGC TCGTCGCTGA Ala Phe Asn Phe 350	1912
TCATACGGTG CTTCAG AAC GGC ACC AAC TTC TTC ATC AAC AAC GCG ACT Asn Gly Thr Asn Phe Phe Ile Asn Asn Ala Thr 355 360	1961
TTC ACG CCG CCG ACC GTC CCG GTA CTC CTC CAG ATT CTG AGC GGT GCG Phe Thr Pro Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala 365 370 375	2009
CAG ACC GCA CAA GAC CTG CTC CCC GCA GGC TCT GTC TAC CCG CTC CCG Gln Thr Ala Gln Asp Leu Leu Pro Ala Gly Ser Val Tyr Pro Leu Pro 380 385 390 395	2057
GCC CAC TCC ACC ATC GAG ATC ACG CTG CCC GCG ACC GCC TTG GCC CCG Ala His Ser Thr Ile Glu Ile Thr Leu Pro Ala Thr Ala Leu Ala Pro 400 405 410	2105
GGT GCA CCG CAC CCC TTC CAC CTG CAC GGT GTATGTTCCC CTGCCTTCCC Gly Ala Pro His Pro Phe His Leu His Gly 415 420	2155
TTCTTATCCC CGAACCAGTG CTCACGTCCG TCCCATCTAG CAC GCC TTC GCG GTC His Ala Phe Ala Val 425	2210
GTT CGC AGC GCG GGG AGC ACC ACG TAT AAC TAC AAC GAC CCG ATC TTC Val Arg Ser Ala Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Phe 430 435 440	2258
CGC GAC GTC GTG AGC ACG GGC ACG CCC GCC GCG GGC GAC AAC GTC ACG Arg Asp Val Val Ser Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr 445 450 455	2306
ATC CGC TTC CAG ACG GAC AAC CCC GGG CCG TGG TTC CTC CAC TGC CAC Ile Arg Phe Gln Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His 460 465 470	2354
ATC GAC TTC CAC CTC GAC GCA GGC TTC GCG ATC GTG TTC GCA GAG GAC Ile Asp Phe His Leu Asp Ala Gly Phe Ala Ile Val Phe Ala Glu Asp 475 480 485 490	2402
GTT GCG GAC GTG AAG GCG GCG AAC CCG GTT CCG AAG GCG TGG TCG GAC Val Ala Asp Val Lys Ala Ala Asn Pro Val Pro Lys Ala Trp Ser Asp 495 500 505	2450
CTG TGC CCG ATC TAC GAC GGG CTG AGC GAG GCT AAC CAG TGAGCGGAGG Leu Cys Pro Ile Tyr Asp Gly Leu Ser Glu Ala Asn Gln 510 515	2499
GCGTGGTGTT GAGCGTAAAG CTCGGGCGTC GACCTGGGGG GTTGAAGGTG TTCTGATTGA	2559
AATGGTCTTT GGGTTTATTT GTTGTTATTC TAACTCGGTT CTCTACGCAA GGACCGAGGA	2619
TTGTATAGGA TGAAGTAACT TCCCTAATGT ATTATGATAT CAATTGACGG AGGCATGGAC	2679
TGCGAAGTGT GTACAATGTG GTAGTGGTCT AGGCCTTGGA GACAAGCTGT GGATTTTTCT	2739
TGGGGGATGA AGAGGCGTGA AGGCTGAGAG CTATGCTATG CCTAGTGACC TGGTTATAGT	2799
AAATGTCCAT TACATTGACC AAGAACGACA AGAACCATAA GCTTGCTGAG GATAGATGGG	2859
GGCGCGTCCG CGAACGACTT G	2880

(2) SEKVENSSIN ID NO:4 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 519 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:4:

```

Met Gly Leu Gln Arg Phe Ser Phe Phe Val Thr Leu Ala Leu Val Ala
 1           5           10           15
Arg Ser Leu Ala Ala Ile Gly Pro Val Ala Ser Leu Val Val Ala Asn
          20           25           30
Ala Pro Val Ser Pro Asp Gly Phe Leu Arg Asp Ala Ile Val Val Asn
          35           40           45
Gly Val Val Pro Ser Pro Leu Ile Thr Gly Lys Lys Gly Asp Arg Phe
 50           55           60
Gln Leu Asn Val Val Asp Thr Leu Thr Asn His Ser Met Leu Lys Ser
 65           70           75           80
Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe Gln Ala Gly Thr Asn Trp Ala
          85           90           95

Glu Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys Pro Ile Ala Ser Gly His Ser
          100           105           110
Phe Leu Tyr Asp Phe His Val Pro Asp Gln Ala Gly Thr Phe Trp Tyr
          115           120           125
His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro Phe
          130           135           140
Val Val Tyr Asp Pro Lys Asp Pro His Ala Ser Arg Tyr Asp Val Asp
          145           150           155           160
Asn Glu Ser Thr Val Ile Thr Leu Thr Asp Trp Tyr His Thr Ala Ala
          165           170           175
Arg Leu Gly Pro Lys Phe Pro Leu Gly Ala Asp Ala Thr Leu Ile Asn
          180           185           190
Gly Leu Gly Arg Ser Ala Ser Thr Pro Thr Ala Ala Leu Ala Val Ile
          195           200           205
Asn Val Gln His Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Ile Ser
          210           215           220
Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp Gly His Asn Leu Thr Val
          225           230           235           240
Ile Glu Val Asp Gly Ile Asn Ser Gln Pro Leu Leu Val Asp Ser Ile
          245           250           255
Gln Ile Phe Ala Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val Leu Asn Ala Asn Gln
          260           265           270
Thr Val Gly Asn Tyr Trp Val Arg Ala Asn Pro Asn Phe Gly Thr Val
          275           280           285
Gly Phe Ala Gly Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Gln Gly Ala
          290           295           300

```

```

Pro Val Ala Glu Pro Thr Thr Thr Gln Thr Pro Ser Val Ile Pro Leu
305                      310                      315                      320

Ile Glu Thr Asn Leu His Pro Leu Ala Arg Met Pro Val Pro Gly Ser
                      325                      330                      335

Pro Thr Pro Gly Gly Val Asp Lys Ala Leu Asn Leu Ala Phe Asn Phe
                      340                      345                      350

Asn Gly Thr Asn Phe Phe Ile Asn Asn Ala Thr Phe Thr Pro Pro Thr
                      355                      360                      365

Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Thr Ala Gln Asp
370                      375                      380

Leu Leu Pro Ala Gly Ser Val Tyr Pro Leu Pro Ala His Ser Thr Ile
385                      390                      395                      400

Glu Ile Thr Leu Pro Ala Thr Ala Leu Ala Pro Gly Ala Pro His Pro
                      405                      410                      415

Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly Ser
                      420                      425                      430

Thr Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser Thr
                      435                      440                      445

Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Gln Thr Asp
450                      455                      460

Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Asp
465                      470                      475                      480

Ala Gly Phe Ala Ile Val Phe Ala Glu Asp Val Ala Asp Val Lys Ala
                      485                      490                      495

Ala Asn Pro Val Pro Lys Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Ile Tyr Asp
                      500                      505                      510

Gly Leu Ser Glu Ala Asn Gln
515

```

(2) SEKVENSSIN ID NO:5 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 - (A) PITUUS: 3102 emäsparia
 - (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 - (C) JUOSTEISUUS: kaksijuosteinen
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (perimän)
- (vi) ALKUPERÄ:
 - (A) ORGANISMI: Polyporus pinsitus
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINTI: 666..720
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 - (A) NIMI/SELITYS: introni
 - (B) SIJAINTI: 790..845

(ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 1125..1182

(ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 1390..1450

(ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 1607..1661

(ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 1863..1918

(ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 1976..2025

(ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 2227..2285

(ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 2403..2458

(ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 2576..2627

(ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: CDS

(B) SIJAINTI:
 liitos (665..721, 789..846, 1124..1183,
 1389..1451, 1606..1662, 1862..1919,
 1975..2026, 2226..2286, 2402..2459,
 2575..2628).

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:5:

TTTCCCGACT AAACCAATCT CAGNCCGCTT CCTCCTAGGG AACCGAGCGA TGTGGCGGCC	60
CTCTCTATCC AAGCTGTCCA TAAGAAGACG TTCAAATGCC GCAGCAAGCG AGGAAATAAG	120
CATCTAACAG TGTTTTTCCC ATAGTCGCAT TTGCGCCGCC TGTCGGACCG ACGCCCCTAG	180
AGCGCTTTGG GAAACGTCGC AAGTGGCGGG TGTTATTCGT GTAGACGAGA CGGTATTTGT	240
CTCATCATTC CCGTGCTTCA GGTGACACA GCCCAAAGGT CTATGTACGG CCCTTCACAT	300
TCCCTGACAC ATTGACGCAA CCCTCGGTGC GCCTCCGACA GTGCCTCGGT TGTAGTATCG	360
GGACGCCCTA GGATGCAAGA TTGGAAGTCA CCAAGGCCCG AAGGGTATAA AATACCGAGA	420
GGTCCTACCA CTTCTGCATC TCCAGTCGCA GAGTTCCTCT CCCTTGCCAG CCACAGCTCG	480

AG ATG TCC TTC TCT AGC CTT CGC CGT GCC TTG GTC TTC CTG GGT GCT Met Ser Phe Ser Ser Leu Arg Arg Ala Leu Val Phe Leu Gly Ala 1 5 10 15	527
TGC AGC AGT GCG CTG GCC TCC ATC GGC CCA GTC ACT GAG CTC GAC ATC Cys Ser Ser Ala Leu Ala Ser Ile Gly Pro Val Thr Glu Leu Asp Ile 20 25 30	575
GTT AAC AAG GTC ATC GCC CCG GAT GGC GTC GCT CGT GAT ACA GTC CTC Val Asn Lys Val Ile Ala Pro Asp Gly Val Ala Arg Asp Thr Val Leu 35 40 45	623
GCC GGG GGC ACG TTC CCG GGC CCA CTC ATC ACA GGA AAG AAG Ala Gly Gly Thr Phe Pro Gly Pro Leu Ile Thr Gly Lys Lys 50 55 60	665
GTATGCTAAG TAGTCCCGCC CCCATCATCC TGTGGCTGAC GTTCGACGCC GCCAG	720
GGT GAC AAC TTC CGC ATC AAC GTC GTC GAC AAG TTG GTT AAC CAG ACT Gly Asp Asn Phe Arg Ile Asn Val Val Asp Lys Leu Val Asn Gln Thr 65 70 75	768
ATG CTG ACA TCC ACC ACC ATT GTATGTCACT AGCTCTCGCT ATCTCGAGAC Met Leu Thr Ser Thr Thr Ile 80	819
CCGCTGACCG ACAACATTTG CCGTAG CAC TGG CAC GGG ATG TTC CAG CAT His Trp His Gly Met Phe Gln His 85 90	859
ACG ACG AAC TGG GCG GAT GGT CCC GCC TTT GTG ACT CAA TGC CCT ATC Thr Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Thr Gln Cys Pro Ile 95 100 105	917
ACC ACT GGT GAT GAT TTC CTG TAC AAC TTC CGC GTG CCC GAC CAG ACA Thr Thr Gly Asp Asp Phe Leu Tyr Asn Phe Arg Val Pro Asp Gln Thr 110 115 120	965
GTACGCAAAG GGCAGCATGC GTACTCAAAG ACATCTCTAA GCATTTGCTA CCTAG	1020
GGA ACG TAC TGG TAC CAT AGC CAT CTG GCC TTG CAG TAC TGT GAT GGG Gly Thr Tyr Trp Tyr His Ser His Leu Ala Leu Gln Tyr Cys Asp Gly 125 130 135 140	1068
CTT CGC GGC CCC CTG GTG ATT TAC GAT CCC CAT GAT CCG CAG GCA TAC Leu Arg Gly Pro Leu Val Ile Tyr Asp Pro His Asp Pro Gln Ala Tyr 145 150 155	1116
CTG TAT GAC GTC GAT GAC GTACGCAGCA CAGTTTCCCT AAAACGGTTA Leu Tyr Asp Val Asp Asp 160	1164
ACTTCTAATT CTGTAAATAT CTTCATAG GAG AGC ACC GTT ATC ACT CTG Glu Ser Thr Val Ile Thr Leu 165	1213
GCA GAC TGG TAC CAT ACC CCG GCG CCT CTG CTG CCG CCT GCC GCG Ala Asp Trp Tyr His Thr Pro Ala Pro Leu Leu Pro Pro Ala Ala 170 175 180	1258
GTACGCCTCC ACACATCTGC ACAGCGTTCC GTATCTCATA CCCTTAAAGT TTATCGGACA	1318
ACT TTG ATT AAT GGC CTG GGT CGC TGG CCT GGC AAC CCC ACC GCC GAC Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Trp Pro Gly Asn Pro Thr Ala Asp 185 190 195 200	1366
CTA GCC GTC ATC GAA GTC CAG CAC GGA AAG CGC GTATGTCATA GCTCGGTTAT Leu Ala Val Ile Glu Val Gln His Gly Lys Arg 205 210	1419

CTATTCATAC TCGCGGCCTC GAAGCTAAAA CCTTGTTC	1472
Tyr Arg Phe Arg 215	
CTG GTC AGC ACC TCA TGC GAC CCC AAC TAC AAC TTC ACT ATC GAT GGC	1520
Leu Val Ser Thr Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Asn Phe Thr Ile Asp Gly 220 225 230	
CAC ACC ATG ACA ATC ATC GAG GCG GAT GGG CAG AAC ACC CAG CCA CAC	1568
His Thr Met Thr Ile Ile Glu Ala Asp Gly Gln Asn Thr Gln Pro His 235 240 245	
CAA GTC GAC GGA CTT CAG ATC TTC GCG GCA CAG CGG TAC TCC TTC GTT	1616
Gln Val Asp Gly Leu Gln Ile Phe Ala Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val 250 255 260	
GTATGTTTTTC CGCATTTTCGG GAAAAGGAAT TGCGCTGACA GCTCGAGTGT GCGTAG	1672
CTT AAC GCT AAC CAA GCG GTC AAC AAC TAC TGG ATC CGT GCG AAC CCT	1720
Leu Asn Ala Asn Gln Ala Val Asn Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Asn Pro 265 270 275	
AAC CGT GCT AAC ACT ACG GGC TTC GCC AAC GGC ATC AAC TCC GCC ATC	1768
Asn Arg Ala Asn Thr Thr Gly Phe Ala Asn Gly Ile Asn Ser Ala Ile 280 285 290 295	
CTG CGC TAC AAG GGG GCG CCG ATT AAG GAG CCT ACG ACG AAC CAG ACT	1816
Leu Arg Tyr Lys Gly Ala Pro Ile Lys Glu Pro Thr Thr Asn Gln Thr 300 305 310	
ACC ATC CGG AAC TTT TTG TGG GAG ACG GAC TTG CAC CCG CTC ACT GAC	1864
Thr Ile Arg Asn Phe Leu Trp Glu Thr Asp Leu His Pro Leu Thr Asp 315 320 325	
CCA CGT GCA GTAAGTTCTA CACAGTCACC AACGGTGAGC TGTTGTCTGA	1913
Pro Arg Ala 330	
TTGCACTGTG TTATAG CCT GGC CTT CCT TTC AAG GGG GGC GTT GAC CAC	1962
Pro Gly Leu Pro Phe Lys Gly Gly Val Asp His 335 340	
GCT TTG AAC CTC AAC CTC ACT TTC GTACGTAGCG CCTCAGATAT CGAGTAGTCT	2016
Ala Leu Asn Leu Asn Leu Thr Phe 345	
ATCTCCTGAC CGATTGACAG AAT GGA TCG GAG TTC TTC ATC AAC GAT GCG	2066
Asn Gly Ser Glu Phe Phe Ile Asn Asp Ala 350 355	
CCT TTC GTC CCT CCG ACT GTC CCG GTG CTA CTG CAG ATC CTG AAC GGA	2114
Pro Phe Val Pro Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Asn Gly 360 365 370 375	
ACG CTC GAC GCG AAC GAC CTC CTG CCG CCC GGC AGC GTC TAC AAC CTT	2162
Thr Leu Asp Ala Asn Asp Leu Leu Pro Pro Gly Ser Val Tyr Asn Leu 380 385 390	
CCT CCG GAC TCC ACC ATC GAG CTG TCC ATT CCC GGA GGT GTG ACG GGT	2210
Pro Pro Asp Ser Thr Ile Glu Leu Ser Ile Pro Gly Gly Val Thr Gly 395 400 405	
GGC CCG CAC CCA TTC CAT TTG CAC GGG GTAATAATCT CTCTTTATAC	2257
Gly Pro His Pro Phe His Leu His Gly 410 415	
TTTGGTCTCC CGATGCTGAC TTTCACTGCT CATCTTCAG CAC GCT TTC TCC GTC	2311
His Ala Phe Ser Val 420	

GTG CGT AGC GCC GGC AGC ACC GAA TAC AAC TAC GCG AAC CCG GTG AAG Val Arg Ser Ala Gly Ser Thr Glu Tyr Asn Tyr Ala Asn Pro Val Lys 425 430 435	2359
CGC GAC ACG GTC AGC ATT GGT CTT GCG GGC GAC AAC GTC ACC GTG CGC Arg Asp Thr Val Ser Ile Gly Leu Ala Gly Asp Asn Val Thr Val Arg 440 445 450	2407
TTC GTG GTATGTTTTA CAGCCTCTCT ATCTCCGTGG GCGTTCGGAA GTTGACTGGG Phe Val 455	2463
GCGTAG ACC GAC AAC CCC GGC CCG TGG TTC CTC CAC TGT CAC ATC GAC Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp 460 465	2511
TTC CAT TTG CAA GCA GGC CTC GCC ATC GTG TTC GCG GAG GAC GCG CAG Phe His Leu Gln Ala Gly Leu Ala Ile Val Phe Ala Glu Asp Ala Gln 470 475 480 485	2559
GAC ACG AAG CTT GTG AAC CCC GTC CCT GTACGTCTTC TGGATGCATG Asp Thr Lys Leu Val Asn Pro Val Pro 490	2606
CGCTCCGCAC AGTGACTCAT CTTTTCGAAC AG GAG GAC TGG AAC AAG CTG TGC Glu Asp Trp Asn Lys Leu Cys 495 500	2659
CCC ACC TTC GAT AAG GCG ATG AAC ATC ACG GTT TGAGCGATGC Pro Thr Phe Asp Lys Ala Met Asn Ile Thr Val 505 510	2702
GTGGCGCTCA TGGTCATTTT CTTGGAATCT TTGCATAGGG CTGCAGCACG CTGGATACTC	2762
TTTCCCTTAG CAGGATATTA TTTAATGACC CCTGCGTTTA GTGCTTAGTT AGCTTTACTA	2822
CTGTTGTAA TGTACGCAGC ATGCGTAATT CGGATAATGC TATCAATGTG TATATTATGA	2882
CACGCGTCAT GCGCGATGCT TGAGTTGCAA GGTCGGTTTC CGATGCTCGA CATAAACGTT	2942
TCACTTACAT ACACATTGGG TCTAGAACTG GATCTATCCA TGTATACAAA AACTCCTCAT	3002
ACAGCTGACT GGGGCGCTCT AGAGCATGGG TCCGATTGAT CAGATGTCGC GAACACGAGC	3062
CTCCTGAGCT CGAGGACTCT GAGAAGCGGC GGTGCGTTCT	3102

(2) SEKVENSSIN ID NO:6 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 512 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(vi) ALKUPERÄ:

- (A) ORGANISMI: Polyporus pinsitus

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:6:

Met Ser Phe Ser Ser Leu Arg Arg Ala Leu Val Phe Leu Gly Ala Cys
1 5 10 15

Ser Ser Ala Leu Ala Ser Ile Gly Pro Val Thr Glu Leu Asp Ile Val
 20 25 30
 Asn Lys Val Ile Ala Pro Asp Gly Val Ala Arg Asp Thr Val Leu Ala
 35 40 45
 Gly Gly Thr Phe Pro Gly Pro Leu Ile Thr Gly Lys Lys Gly Asp Asn
 50 55 60
 Phe Arg Ile Asn Val Val Asp Lys Leu Val Asn Gln Thr Met Leu Thr
 65 70 75 80
 Ser Thr Thr Ile His Trp His Gly Met Phe Gln His Thr Thr Asn Trp
 85 90 95
 Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Thr Gln Cys Pro Ile Thr Thr Gly Asp
 100 105 110
 Asp Phe Leu Tyr Asn Phe Arg Val Pro Asp Gln Thr Gly Thr Tyr Trp
 115 120 125
 Tyr His Ser His Leu Ala Leu Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro
 130 135 140
 Leu Val Ile Tyr Asp Pro His Asp Pro Gln Ala Tyr Leu Tyr Asp Val
 145 150 155 160
 Asp Asp Glu Ser Thr Val Ile Thr Leu Ala Asp Trp Tyr His Thr Pro
 165 170 175
 Ala Pro Leu Leu Pro Pro Ala Ala Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg
 180 185 190
 Trp Pro Gly Asn Pro Thr Ala Asp Leu Ala Val Ile Glu Val Gln His
 195 200 205
 Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Thr Ser Cys Asp Pro Asn
 210 215 220
 Tyr Asn Phe Thr Ile Asp Gly His Thr Met Thr Ile Ile Glu Ala Asp
 225 230 235 240
 Gly Gln Asn Thr Gln Pro His Gln Val Asp Gly Leu Gln Ile Phe Ala
 245 250 255
 Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val Leu Asn Ala Asn Gln Ala Val Asn Asn
 260 265 270
 Tyr Trp Ile Arg Ala Asn Pro Asn Arg Ala Asn Thr Thr Gly Phe Ala
 275 280 285
 Asn Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Lys Gly Ala Pro Ile Lys
 290 295 300
 Glu Pro Thr Thr Asn Gln Thr Thr Ile Arg Asn Phe Leu Trp Glu Thr
 305 310 315 320
 Asp Leu His Pro Leu Thr Asp Pro Arg Ala Pro Gly Leu Pro Phe Lys
 325 330 335
 Gly Gly Val Asp His Ala Leu Asn Leu Asn Leu Thr Phe Asn Gly Ser
 340 345 350
 Glu Phe Phe Ile Asn Asp Ala Pro Phe Val Pro Pro Thr Val Pro Val
 355 360 365
 Leu Leu Gln Ile Leu Asn Gly Thr Leu Asp Ala Asn Asp Leu Leu Pro
 370 375 380

```

Pro Gly Ser Val Tyr Asn Leu Pro Pro Asp Ser Thr Ile Glu Leu Ser
385                               395                               400

Ile Pro Gly Gly Val Thr Gly Gly Pro His Pro Phe His Leu His Gly
                               405                               410                               415

His Ala Phe Ser Val Val Arg Ser Ala Gly Ser Thr Glu Tyr Asn Tyr
                               420                               425                               430

Ala Asn Pro Val Lys Arg Asp Thr Val Ser Ile Gly Leu Ala Gly Asp
                               435                               440                               445

Asn Val Thr Val Arg Phe Val Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu
                               450                               455                               460

His Cys His Ile Asp Phe His Leu Gln Ala Gly Leu Ala Ile Val Phe
465                               470                               475                               480

Ala Glu Asp Ala Gln Asp Thr Lys Leu Val Asn Pro Val Pro Glu Asp
                               485                               490                               495

Trp Asn Lys Leu Cys Pro Thr Phe Asp Lys Ala Met Asn Ile Thr Val
                               500                               505                               510

```

(2) SEKVENSSIN ID NO:7 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 2860 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksijuosteinen
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ix) OMINAISPIIRRE:

- (A) NIMI/SELITYS: introni
- (B) SIJAINTI: 851..905

(ix) OMINAISPIIRRE:

- (A) NIMI/SELITYS: introni
- (B) SIJAINTI: 1266..1320

(ix) OMINAISPIIRRE:

- (A) NIMI/SELITYS: introni
- (B) SIJAINTI: 1351..1376

(ix) OMINAISPIIRRE:

- (A) NIMI/SELITYS: introni
- (B) SIJAINTI: 1416..1468

(ix) OMINAISPIIRRE:

- (A) NIMI/SELITYS: introni
- (B) SIJAINTI: 1625..1683

(ix) OMINAISPIIRRE:

- (A) NIMI/SELITYS: introni
- (B) SIJAINTI: 1882..1934

(ix) OMINAISPIIRRE:

- (A) NIMI/SELITYS: introni
- (B) SIJAINTI: 2202..2252

(ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 2370..2425

(ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 2543..2599

(ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: CDS
 (B) SIJAINTI:
 liitos(540..725, 782..850, 906..1025, 1086..1265,
 1321..1350, 1377..1415, 1469..1624, 1684..1881,
 1935..2201, 2253..2369, 2426..2542, 2600..2653)

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:7:

GGGGGGCGCG TCAATGGTCC GTTTGCGAAC ACATATGCAG GATAAACAGT GCGAAATATC	60
AATGTGGCGG CGACACAACC TCGCCGGCCG AACTCGACG CTGTTGATCA TGATCATGTC	120
TTGTGAGCAT TCTATACGCA GCCTTGAAA TCTCAGGCGA ATTTGTCTGA ATTGCGCTGG	180
GAGGCTGGCA GCGCAGATCG GTGTGTCGGT GCAGTAGCCG ACGCAGCACC TGGCGGAAGC	240
CGACATCTCG GGTACGACTT GATCTCCGCC AGATCACTGC GGTTCGGCCA TCGGCCGCGG	300
GGCCCATTTCT GTGTGTGCGC TGTAGCACTC TGCATTCAAG CTCAACGTAT CCATGCTAGA	360
GGACCGTCCA GCTGTTGGCG CACGATTGCG GCAGAAAGCT GTACAGGCAG ATATAAGGAT	420
GTCCGTCCGT CAGAGACTCG TCACTCACAA GCCTCTTTTC CTCTTCGCCT TTCCAGCCTC	480
TTCCAACGCC TGCCATCGTC CTCTTAGTTC GCTCGTCCAT TCTTTCTGCG TAGTTAATC	539
ATG GGC AGG TTC TCA TCT CTC TGC GCG CTC ACC GCC GTC ATC CAC TCT	587
Met Gly Arg Phe Ser Ser Leu Cys Ala Leu Thr Ala Val Ile His Ser	
1 5 10 15	
TTT GGT CGT GTC TCC GCC GCT ATC GGG CCT GTG ACC GAC CTC ACC ATC	635
Phe Gly Arg Val Ser Ala Ala Ile Gly Pro Val Thr Asp Leu Thr Ile	
20 25 30	
TCC AAT GGG GAC GTT TCT CCC GAC GGC TTC ACT CGT GCC GCA GTG CTT	683
Ser Asn Gly Asp Val Ser Pro Asp Gly Phe Thr Arg Ala Ala Val Leu	
35 40 45	
GCA AAC GGC GTC TTC CCG GGT CCT CTT ATC ACG GGA AAC AAG	725
Ala Asn Gly Val Phe Pro Gly Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys	
50 55 60	
GTACGTGGCA TGC GTTCAGT CTACACCCTA CAAGCCTTCT AACTCTTTTA CCACAG	781
GGC GAC AAC TTC CAG ATC AAT GTT ATC GAC AAC CTC TCT AAC GAG ACG	829
Gly Asp Asn Phe Gln Ile Asn Val Ile Asp Asn Leu Ser Asn Glu Thr	
65 70 75	
ATG TTG AAG TCG ACC TCC ATC GTATGTGCTT CTA CTGCTTC TTAGTCTTGG	880
Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile	
80 85	
CAATGGCTCA AGGTCTCCTC CGCAG CAT TGG CAC GGC TTC TTC CAG AAG GGT	932
His Trp His Gly Phe Phe Gln Lys Gly	
90	

ACT AAC TGG GCT GAT GGA GCT GCC TTC GTC AAC CAG TGC CCT ATC GCG Thr Asn Trp Ala Asp Gly Ala Ala Phe Val Asn Gln Cys Pro Ile Ala 95 100 105 110	980
ACG GGG AAC TCT TTC CTT TAC GAC TTC ACC GCG ACG GAC CAA GCA Thr Gly Asn Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Thr Ala Thr Asp Gln Ala 115 120 125	1025
GTCAGTGCCT GTGGCGCTTA TGTTTCCCG TAATCAGCAG CTAACACTCC GCACCCACAG	1085
GGC ACC TTC TGG TAC CAC AGT CAC TTG TCT ACG CAG TAC TGC GAT GGT Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly 130 135 140	1133
TTG CGG GGC CCG ATG GTC GTA TAC GAC CCG AGT GAC CCG CAT GCG GAC Leu Arg Gly Pro Met Val Val Tyr Asp Pro Ser Asp Pro His Ala Asp 145 150 155	1181
CTT TAC GAC GTC GAC GAC GAG ACC ACG ATC ATC ACG CTC TCT GAT TGG Leu Tyr Asp Val Asp Asp Glu Thr Thr Ile Ile Thr Leu Ser Asp Trp 160 165 170	1229
TAT CAC ACC GCT GCT TCG CTC GGT GCT GCC TTC CCG GTAAGTTTAC Tyr His Thr Ala Ala Ser Leu Gly Ala Ala Phe Pro 175 180 185	1275
CCCAGCGCAC GGAGTTAAGA CCGGATCTAA CTGTAATACG TTCAG ATT GGC TCG Ile Gly Ser	1329
GAC TCT ACC CTG ATT AAC GGC GTTGGCCGCT TCGCGGGTGG TGACAG ACT GAC Asp Ser Thr Leu Ile Asn Gly Thr Asp 190 195	1382
CTT GCG GTT ATC ACT GTC GAG CAG GGC AAG CGC GTTAGTGATA CCCTCTACAG Leu Ala Val Ile Thr Val Glu Gln Gly Lys Arg 200 205	1435
TTGACACTGT GCCATTGCTG ACAGTACTCT CAG TAC CGT ATG CGT CTT CTC TCG Tyr Arg Met Arg Leu Leu Ser 210 215	1489
CTG TCT TGC GAC CCC AAC TAT GTC TTC TCC ATT GAC GGC CAC AAC ATG Leu Ser Cys Asp Pro Asn Tyr Val Phe Ser Ile Asp Gly His Asn Met 220 225 230	1537
ACC ATC ATC GAG GCC GAC GCC GTC AAC CAC GAG CCC CTC ACG GTT GAC Thr Ile Ile Glu Ala Asp Ala Val Asn His Glu Pro Leu Thr Val Asp 235 240 245	1585
TCC ATC CAG ATC TAC GCC GGC CAA CGT TAC TCC TTC GTC GTACGTATTC Ser Ile Gln Ile Tyr Ala Gly Gln Arg Tyr Ser Phe Val 250 255 260	1634
CGAACAGCCA TGATCAGGCC AAGCCCGATG CTAACGCGCC TACCCTCAG CTT ACC Leu Thr	1689
GCT GAC CAG GAC ATC GAC AAC TAC TTC ATC CGT GCC CTG CCC AGC GCC Ala Asp Gln Asp Ile Asp Asn Tyr Phe Ile Arg Ala Leu Pro Ser Ala 265 270 275	1737
GGT ACC ACC TCG TTC GAC GGC GGC ATC AAC TCG GCT ATC CTG CGC TAC Gly Thr Thr Ser Phe Asp Gly Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr 280 285 290	1785
TCT GGT GCC TCC GAG GTT GAC CCG ACG ACC ACG GAG ACC ACG AGC GTC Ser Gly Ala Ser Glu Val Asp Pro Thr Thr Thr Glu Thr Thr Ser Val 295 300 305 310	1833

CTC CCC CTC GAC GAG GCG AAC CTC GTG CCC CTT GAC AGC CCC GCT GCT Leu Pro Leu Asp Glu Ala Asn Leu Val Pro Leu Asp Ser Pro Ala Ala 315 320 325	1881
GTACGTCGTA TTCTGCGCTT GCAAGGATCG CACATACTAA CATGCTCTTG TAG CCC Pro	1937
GGT GAC CCC AAC ATT GGC GGT GTC GAC TAC GCG CTG AAC TTG GAC TTC Gly Asp Pro Asn Ile Gly Gly Val Asp Tyr Ala Leu Asn Leu Asp Phe 330 335 340	1985
AAC TTC GAT GGC ACC AAC TTC TTC ATC AAC GAC GTC TCC TTC GTG TCC Asn Phe Asp Gly Thr Asn Phe Phe Ile Asn Asp Val Ser Phe Val Ser 345 350 355	2033
CCC ACG GTC CCT GTC CTC CTC CAG ATT CTT AGC GGC ACC ACC TCC GCG Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Thr Thr Ser Ala 360 365 370 375	2081
GCC GAC CTT CTC CCC AGC GGT AGT CTC TTC GCG GTC CCG TCC AAC TCG Ala Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Leu Phe Ala Val Pro Ser Asn Ser 380 385 390	2129
ACG ATC GAG ATC TCG TTC CCC ATC ACC GCG ACG AAC GCT CCC GGC GCG Thr Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ile Thr Ala Thr Asn Ala Pro Gly Ala 395 400 405	2177
CCG CAT CCC TTC CAC TTG CAC GGT GTACGTGTCC CATCTCATAT GCTACGGAGC Pro His Pro Phe His Leu His Gly 410 415	2231
TCCACGCTGA CCGCCCTATA G CAC ACC TTC TCT ATC GTT CGT ACC GCC GGC His Thr Phe Ser Ile Val Arg Thr Ala Gly 420 425	2282
AGC ACG GAT ACG AAC TTC GTC AAC CCC GTC CGC CGC GAC GTC GTG AAC Ser Thr Asp Thr Asn Phe Val Asn Pro Val Arg Arg Asp Val Val Asn 430 435 440	2330
ACC GGT ACC GTC GGC GAC AAC GTC ACC ATC CGC TTC ACG GTACGCAGCA Thr Gly Thr Val Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Thr 445 450	2379
CTCTCCTAAC ATTCCCACTG CGCGATCACT GACTCCTCGC CCACAG ACT GAC AAC Thr Asp Asn 455	2434
CCC GGC CCC TGG TTC CTC CAC TGC CAC ATC GAC TTC CAC TTG GAG GCC Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Glu Ala 460 465 470	2482
GGT TTC GCC ATC GTC TTC AGC GAG GAC ACC GCC GAC GTC TCG AAC ACG Gly Phe Ala Ile Val Phe Ser Glu Asp Thr Ala Asp Val Ser Asn Thr 475 480 485	2530
ACC ACG CCC TCG GTACGTTGTG CTCCCGTGCC CATCTCCGCG CGCCTGACTA Thr Thr Pro Ser 490	2582
ACGAGCACCC CTTACAG ACT GCT TGG GAA GAT CTG TGC CCC ACG TAC AAC Thr Ala Trp Glu Asp Leu Cys Pro Thr Tyr Asn 495 500	2632
GCT CTT GAC TCA TCC GAC CTC TAATCGGTTC AAAGGGTCGC TCGCTACCTT Ala Leu Asp Ser Ser Asp Leu 505 510	2683
AGTAGGTAGA CTTATGCACC GGACATTATC TACAATGGAC TTTAATTTGG GTTAACGGCC	2743

GTTATACATA CGCGCACGTA GTATAAAGGT TCTCTGGATT GGTCGGACCT ACAGACTGCA 2803
 ATTTTCGTGA CCTATCAACT GTATATTGAA GCACGACAGT GAATGGAAAT AGAGACA 2860

(2) SEKVENSSIN ID NO:8 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 511 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:8:

Met	Gly	Arg	Phe	Ser	Ser	Leu	Cys	Ala	Leu	Thr	Ala	Val	Ile	His	Ser	1	5	10	15
Phe	Gly	Arg	Val	Ser	Ala	Ala	Ile	Gly	Pro	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Ile	20	25	30	
Ser	Asn	Gly	Asp	Val	Ser	Pro	Asp	Gly	Phe	Thr	Arg	Ala	Ala	Val	Leu	35	40	45	
Ala	Asn	Gly	Val	Phe	Pro	Gly	Pro	Leu	Ile	Thr	Gly	Asn	Lys	Gly	Asp	50	55	60	
Asn	Phe	Gln	Ile	Asn	Val	Ile	Asp	Asn	Leu	Ser	Asn	Glu	Thr	Met	Leu	65	70	75	80
Lys	Ser	Thr	Ser	Ile	His	Trp	His	Gly	Phe	Phe	Gln	Lys	Gly	Thr	Asn	85	90	95	
Trp	Ala	Asp	Gly	Ala	Ala	Phe	Val	Asn	Gln	Cys	Pro	Ile	Ala	Thr	Gly	100	105	110	
Asn	Ser	Phe	Leu	Tyr	Asp	Phe	Thr	Ala	Thr	Asp	Gln	Ala	Gly	Thr	Phe	115	120	125	
Trp	Tyr	His	Ser	His	Leu	Ser	Thr	Gln	Tyr	Cys	Asp	Gly	Leu	Arg	Gly	130	135	140	
Pro	Met	Val	Val	Tyr	Asp	Pro	Ser	Asp	Pro	His	Ala	Asp	Leu	Tyr	Asp	145	150	155	160
Val	Asp	Asp	Glu	Thr	Thr	Ile	Ile	Thr	Leu	Ser	Asp	Trp	Tyr	His	Thr	165	170	175	
Ala	Ala	Ser	Leu	Gly	Ala	Ala	Phe	Pro	Ile	Gly	Ser	Asp	Ser	Thr	Leu	180	185	190	
Ile	Asn	Gly	Thr	Asp	Leu	Ala	Val	Ile	Thr	Val	Glu	Gln	Gly	Lys	Arg	195	200	205	
Tyr	Arg	Met	Arg	Leu	Leu	Ser	Leu	Ser	Cys	Asp	Pro	Asn	Tyr	Val	Phe	210	215	220	
Ser	Ile	Asp	Gly	His	Asn	Met	Thr	Ile	Ile	Glu	Ala	Asp	Ala	Val	Asn	225	230	235	240
His	Glu	Pro	Leu	Thr	Val	Asp	Ser	Ile	Gln	Ile	Tyr	Ala	Gly	Gln	Arg	245	250	255	
Tyr	Ser	Phe	Val	Leu	Thr	Ala	Asp	Gln	Asp	Ile	Asp	Asn	Tyr	Phe	Ile	260	265	270	

```

Arg Ala Leu Pro Ser Ala Gly Thr Thr Ser Phe Asp Gly Gly Ile Asn
275                                280                                285

Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Ser Gly Ala Ser Glu Val Asp Pro Thr Thr
290                                295                                300

Thr Glu Thr Thr Ser Val Leu Pro Leu Asp Glu Ala Asn Leu Val Pro
305                                310                                315                                320

Leu Asp Ser Pro Ala Ala Pro Gly Asp Pro Asn Ile Gly Gly Val Asp
325                                330                                335

Tyr Ala Leu Asn Leu Asp Phe Asn Phe Asp Gly Thr Asn Phe Phe Ile
340                                345                                350

Asn Asp Val Ser Phe Val Ser Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile
355                                360                                365

Leu Ser Gly Thr Thr Ser Ala Ala Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Leu
370                                375                                380

Phe Ala Val Pro Ser Asn Ser Thr Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ile Thr
385                                390                                395                                400

Ala Thr Asn Ala Pro Gly Ala Pro His Pro Phe His Leu His Gly His
405                                410                                415

Thr Phe Ser Ile Val Arg Thr Ala Gly Ser Thr Asp Thr Asn Phe Val
420                                425                                430

Asn Pro Val Arg Arg Asp Val Val Asn Thr Gly Thr Val Gly Asp Asn
435                                440                                445

Val Thr Ile Arg Phe Thr Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His
450                                455                                460

Cys His Ile Asp Phe His Leu Glu Ala Gly Phe Ala Ile Val Phe Ser
465                                470                                475                                480

Glu Asp Thr Ala Asp Val Ser Asn Thr Thr Thr Pro Ser Thr Ala Trp
485                                490                                495

Glu Asp Leu Cys Pro Thr Tyr Asn Ala Leu Asp Ser Ser Asp Leu
500                                505                                510

```

(2) SEKVENSSIN ID NO:9 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 2925 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: kaksijuosteinen
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (perimän)

(vi) ALKUPERÄ:

- (A) ORGANISMI: Polyporus pinsitus

(ix) OMINAISPIIRRE:

- (A) NIMI/SELITYS: introni
- (B) SIJAINTI: 734..808

- (ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 878..932
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 1051..1104
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 1219..1270
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 1336..1397
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 1713..7744
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 2030..2085
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 2308..2375
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: introni
 (B) SIJAINTI: 2492..2569
- (ix) OMINAISPIIRRE:
 (A) NIMI/SELITYS: CDS
 (B) SIJAINTI:
 liitos(733..809, 877..933, 1050..1105, 1218..1271,
 1335..1398, 1712..1775, 2029..2086, 2307..2376,
 2492..2570).
 2542..2600).

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:9:

CTCATAACTC TTCGCTTCTA GCATGGGGGC TGCACACACC TGACAGACCC TTCGGGAGGC	60
GAACTCGAAT GCAGCGTACT CTATCNCACC TCCAGGAAAG GTAGGGATGG ACNCCGTGCA	120
CCAACAAC TG TCTCTCCACC AGCAACCATC CCTTGGATAT GTCTCCACAC ACCCGGTGTC	180
TACAAGCGGG GATCTGTGCT GGTGAAGTGC TGTCTCCGGA GCGGCGGCGG CGAGCGACCA	240
GAACCCGAAC CAGTGCTAGT GCCCGACACC CGCGAGACAA TTGTGCAGGG TGAGTTATAT	300
TCTTCGTGAG ACGGCGCTGC GCGTCGGCAC TGAAAGCGTC GCAGTTAGGT GATGCAGCGG	360
TCCGCGCTAT TTTTGACGTC TGGCAGCTAT CCTAAGCCGC GCCTCCATAC ACCCCAGGCG	420
CTCTCGTTTG CTATAGGTAT AAATCCCTCA GCTTCAGAGC GTCGATCCTC ATCCACACG	480
ACACCCGTTT CAGTCTTCTC GTAGCGCATT CCCTAGCCGC CCAGCCTCCG CTTTCGTTTT	540

CAAC ATG GGC AAG TAT CAC TCT TTT GTG AAC GTC GTC GCC CTT AGT CTT Met Gly Lys Tyr His Ser Phe Val Asn Val Val Ala Leu Ser Leu 1 5 10 15	589
TCT TTG AGC GGT CGT GTG TTC GGC GCC ATT GGG CCC GTC ACC GAC TTG Ser Leu Ser Gly Arg Val Phe Gly Ala Ile Gly Pro Val Thr Asp Leu 20 25 30	637
ACT ATC TCT AAC GCC GAT GTT ACG CCT GAC GGC ATT ACT CGT GCT GCT Thr Ile Ser Asn Ala Asp Val Thr Pro Asp Gly Ile Thr Arg Ala Ala 35 40 45	685
GTC CTC GCG GGC GGC GTT TTC CCC GGG CCC CTC ATT ACC GGC AAC AAG Val Leu Ala Gly Gly Val Phe Pro Gly Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys 50 55 60	733
GTGAGCCGCG AAACCTTCTA CTAGCGCGCT CGTACGGTGC ACCGTTACTG AAGCCACACT	793
TTGCGCTGTC AACAG GGG GAT GAA TTC CAG ATC AAT GTC ATC GAC AAC CTG Gly Asp Glu Phe Gln Ile Asn Val Ile Asp Asn Leu 65 70 75	844
ACC AAC GAG ACC ATG TTG AAG TCG ACC ACA ATC GTAAGGTGCT TGCTCCCAT Thr Asn Glu Thr Met Leu Lys Ser Thr Thr Ile 80 85	897
ATTAAGCCCC TCGCTGACTC GAAGTTTATC TGTAG CAC TGG CAT GGT ATC TTC His Trp His Gly Ile Phe 90	950
CAG GCC GGC ACC AAC TGG GCA GAC GGC GCG GCC TTC GTG AAC CAG TGC Gln Ala Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Ala Ala Phe Val Asn Gln Cys 95 100 105	998
CCT ATC GCC ACG GGA AAC TCG TTC TTG TAC GAC TTC ACC GTT CCT GAT Pro Ile Ala Thr Gly Asn Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Thr Val Pro Asp 110 115 120	1046
CAA GCC GTACGTTTAT ACACTTCCCT TTCTGCGGCA TACTCTGACG CGCCGCTGGA Gln Ala 125	1102
TCAG GGC ACC TTC TGG TAC CAC AGC CAC CTG TCC ACC CAG TAC TGT GAC Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp 130 135 140	1151
GGC CTG CGC GGT CCT CTT GTG GTC TAC GAC CCC GAC GAT CCC AAC GCG Gly Leu Arg Gly Pro Leu Val Val Tyr Asp Pro Asp Asp Pro Asn Ala 145 150 155	1199
TCT CTT TAC GAC GTC GAT GAC GTAAGCAGGC TACTTGTGGA CTTGTATGGA Ser Leu Tyr Asp Val Asp Asp 160	1250
TGTATCTCAC GCTCCCCTAC AG GAT ACT ACG GTT ATT ACG CTT GCG GAC TGG Asp Thr Thr Val Ile Thr Leu Ala Asp Trp 165 170	1302
TAC CAC ACT GCG GCG AAG CTG GGC CCT GCC TTC CCC GTGAGTCTAC Tyr His Thr Ala Ala Lys Leu Gly Pro Ala Phe Pro 175 180 185	1348
TCTTCCTCGT GTGTTAACAT AGGTGACGGC CGCTGATACG AGAGCTACCA G GCG GGT Ala Gly	1405
CCG GAT AGC GTC TTG ATC AAT GGT CTT GGT CGG TTC TCC GGC GAT GGT Pro Asp Ser Val Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Phe Ser Gly Asp Gly 190 195 200	1453
GGA GGA GCG ACA AAC CTC ACC GTG ATC ACC GTC ACG CAA GGC AAA CGG	1501

Gly Gly Ala Thr Asn Leu Thr Val Ile Thr Val Thr Gln Gly Lys Arg	
205 210 215 220	
GTGAGTCCGC CCTGAGCTGG CCTCAATAGC GATATTGACG AGTCCATGCC CTCCCAG	1558
TAC CGC TTC CGC CTT GTG TCG ATC TCG TGC GAC CCC AAC TTC ACG TTC	1606
Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Ile Ser Cys Asp Pro Asn Phe Thr Phe	
225 230 235	
TCG ATC GAC GGG CAC AAC ATG ACC ATC ATC GAG GTG GAC GGT GTC AAC	1654
Ser Ile Asp Gly His Asn Met Thr Ile Ile Glu Val Asp Gly Val Asn	
240 245 250	
CAC GAG GCC TTG GAC GTC GAC TCC ATT CAG ATT TTT GCG GGG CAG CGG	1702
His Glu Ala Leu Asp Val Asp Ser Ile Gln Ile Phe Ala Gly Gln Arg	
255 260 265	
TAC TCC TTC ATC GTACGTTCCC TTGCCCTCGT GCTATATCCG CCCGTCTGCT	1754
Tyr Ser Phe Ile	
270	
CACAGAGGCT TCTATATCGC AG CTC AAC GCC AAC CAG TCC ATC GAC AAC	1803
Leu Asn Ala Asn Gln Ser Ile Asp Asn	
275 280	
TAC TGG ATC CGC GCG ATC CCC AAC ACC GGT ACC ACC GAC ACC ACG GGC	1851
Tyr Trp Ile Arg Ala Ile Pro Asn Thr Gly Thr Thr Asp Thr Thr Gly	
285 290 295	
GGC GTG AAC TCT GCT ATT CTT CGC TAC GAC ACC GCA GAA GAT ATC GAG	1899
Gly Val Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Glu Asp Ile Glu	
300 305 310	
CCT ACG ACC AAC GCG ACC ACC TCC GTC ATC CCT CTC ACC GAG ACG GAT	1947
Pro Thr Thr Asn Ala Thr Thr Ser Val Ile Pro Leu Thr Glu Thr Asp	
315 320 325	
CTG GTG CCG CTC GAC AAC CCT GCG GCT CCC GGT GAC CCC CAG GTC GGC	1995
Leu Val Pro Leu Asp Asn Pro Ala Ala Pro Gly Asp Pro Gln Val Gly	
330 335 340 345	
GGT GTT GAC CTG GCT ATG AGT CTC GAC TTC TCC TTC GTGAGTCCCA	2041
Gly Val Asp Leu Ala Met Ser Leu Asp Phe Ser Phe	
350 355	
CAGCACTCCG CGCCATTTCTG CTTATTTACG CAGGAGTATT GTTCAG AAC GGT TCC	2096
Asn Gly Ser	
360	
AAC TTC TTT ATC AAC AAC GAG ACC TTC GTC CCG CCC ACA GTT CCC GTG	2144
Asn Phe Phe Ile Asn Asn Glu Thr Phe Val Pro Pro Thr Val Pro Val	
365 370 375	
CTC CTG CAG ATT TTG AGT GGT GCG CAG GAC GCG GCG AGC CTG CTC CCC	2192
Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Asp Ala Ala Ser Leu Leu Pro	
380 385 390	
AAC GGG AGT GTC TAC ACA CTC CCT TCG AAC TCG ACC ATT GAG ATC TCG	2240
Asn Gly Ser Val Tyr Thr Leu Pro Ser Asn Ser Thr Ile Glu Ile Ser	
395 400 405	
TTC CCC ATC ATC ACC ACC GAC GGT GTT CTG AAC GCG CCC GGT GCT CCG	2288
Phe Pro Ile Ile Thr Thr Asp Gly Val Leu Asn Ala Pro Gly Ala Pro	
410 415 420	
CAC CCG TTC CAT CTC CAC GGC GTAAGTCCTT GCTTTCCTCA GTGCCTCGCT	2339
His Pro Phe His Leu Gly	
425 430	
TCCACGACGT CCACTGATCC CACACATCCC ATGTGCAG CAC ACC TTC TCG GTG	2392

(2) SEKVENSSIN ID NO:10 TIEDOT:

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(A) ORGANISMI: Polyporus pinsitus

Leu Ala Gly Gly Val Phe Pro Gly Pro Leu Ile Thr Gly Asn Lys Gly

50	55	60
Asp Glu Phe Gln Ile Asn Val Ile Asp Asn Leu Thr Asn Glu Thr Met 65 70 75 80		
Leu Lys Ser Thr Thr Ile His Trp His Gly Ile Phe Gln Ala Gly Thr 85 90 95		
Asn Trp Ala Asp Gly Ala Ala Phe Val Asn Gln Cys Pro Ile Ala Thr 100 105 110		
Gly Asn Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Thr Val Pro Asp Gln Ala Gly Thr 115 120 125		
Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg 130 135 140		
Gly Pro Leu Val Val Tyr Asp Pro Asp Asp Pro Asn Ala Ser Leu Tyr 145 150 155 160		
Asp Val Asp Asp Asp Thr Thr Val Ile Thr Leu Ala Asp Trp Tyr His 165 170 175		
Thr Ala Ala Lys Leu Gly Pro Ala Phe Pro Ala Gly Pro Asp Ser Val 180 185 190		
Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Phe Ser Gly Asp Gly Gly Gly Ala Thr 195 200 205		
Asn Leu Thr Val Ile Thr Val Thr Gln Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg 210 215 220		
Leu Val Ser Ile Ser Cys Asp Pro Asn Phe Thr Phe Ser Ile Asp Gly 225 230 235 240		
His Asn Met Thr Ile Ile Glu Val Asp Gly Val Asn His Glu Ala Leu 245 250 255		
Asp Val Asp Ser Ile Gln Ile Phe Ala Gly Gln Arg Tyr Ser Phe Ile 260 265 270		
Leu Asn Ala Asn Gln Ser Ile Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Ile Pro 275 280 285		
Asn Thr Gly Thr Thr Asp Thr Thr Gly Gly Val Asn Ser Ala Ile Leu 290 295 300		
Arg Tyr Asp Thr Ala Glu Asp Ile Glu Pro Thr Thr Asn Ala Thr Thr 305 310 315 320		
Ser Val Ile Pro Leu Thr Glu Thr Asp Leu Val Pro Leu Asp Asn Pro 325 330 335		
Ala Ala Pro Gly Asp Pro Gln Val Gly Gly Val Asp Leu Ala Met Ser 340 345 350		
Leu Asp Phe Ser Phe Asn Gly Ser Asn Phe Phe Ile Asn Asn Glu Thr 355 360 365		
Phe Val Pro Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala 370 375 380		
Gln Asp Ala Ala Ser Leu Leu Pro Asn Gly Ser Val Tyr Thr Leu Pro 385 390 395 400		
Ser Asn Ser Thr Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ile Ile Thr Thr Asp Gly 405 410 415		
Val Leu Asn Ala Pro Gly Ala Pro His Pro Phe His Leu His Gly His		

			420					425					430			
Thr	Phe	Ser	Val	Val	Arg	Ser	Ala	Gly	Ser	Ser	Thr	Phe	Asn	Tyr	Ala	
		435					440					445				
Asn	Pro	Val	Arg	Arg	Asp	Thr	Val	Ser	Thr	Gly	Asn	Ser	Gly	Asp	Asn	
	450					455					460					
Val	Thr	Ile	Arg	Phe	Thr	Thr	Asp	Asn	Pro	Gly	Pro	Trp	Phe	Leu	His	
465					470					475					480	
Cys	His	Ile	Asp	Phe	His	Leu	Glu	Ala	Gly	Phe	Ala	Ile	Val	Trp	Gly	
				485					490					495		
Glu	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	Ser	Ala	Asn	Pro	Val	Pro	Thr	Ala	Trp	
			500					505					510			
Ser	Asp	Leu	Cys	Pro	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	Asp	Ser	Ser	Asp	Leu		
		515					520					525				

Applicant's or agent's file reference number	4185.204-WO	International application to be assigned	PCT/US 95/07536
---	-------------	---	-----------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13 bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>55</u> . line <u>4</u> .	
B. IDENTIFICATION OF Further deposits are identified on an additional sheet ☒	
Name of depository institution Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL)	
Address of depository institution (including postal code and country) Northern Regional Research Center 1815 University Street Peoria, IL 61604, US	
Date of deposit May 25, 1995	Accession Number NRRL B-21263
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
In respect of those designations in which a European and/or Australia Patent is sought, during the pendency of the patent application, a sample of the deposited microorganism is only to be provided to an independent expert nominated by the person requesting the sample (Rule 28(4) EPC/Regulation 3.25 of Australia Statutory Rule 1991 No. 71).	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indication listed below will be submitted to the International Bureau Later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only

☐ This sheet was received with the international application
Authorized officer Doris L. Brock <i>DLB</i> PCT International Division

For International Bureau use only

☐ This sheet was received with the International Bureau on:
Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	4185204-WO	International application N to be assigned	PCT/US 95/07536
---	------------	---	-----------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13 bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>55</u> , line <u>6</u>	
B. IDENTIFICATION OF Further deposits are identified on an additional sheet ☒	
Name of depository institution Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL)	
Address of depository institution (including postal code and country) Northern Regional Research Center 1815 University Street Peoria, IL 61604, US	
Date of deposit May 25, 1995	Accession Number NRRL B-21268
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
In respect of those designations in which a European and/or Australia Patent is sought, during the pendency of the patent application, a sample of the deposited microorganism is only to be provided to an independent expert nominated by the person requesting the sample (Rule 28(4) EPC/Regulation 3.25 of Australia Statutory Rule 1991 No. 71).	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indication listed below will be submitted to the International Bureau Later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only

☐ This sheet was received with the international application
Authorized officer <u>Doris L. Brock</u> PCT International Division

For International Bureau use only

☐ This sheet was received with the International Bureau on:
Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	4185.204-WO	International application N to be assigned	PCT/US 95/07536
---	-------------	---	-----------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13 bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page 55, line 11	
B. IDENTIFICATION OF Further deposits are identified on an additional sheet ☒	
Name of depository institution Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL)	
Address of depository institution (including postal code and country) Northern Regional Research Center 1815 University Street Peoria, IL 61604, US	
Date of deposit May 25, 1995	Accession Number NRRL B-21264
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
In respect of those designations in which a European and/or Australia Patent is sought, during the pendency of the patent application, a sample of the deposited microorganism is only to be provided to an independent expert nominated by the person requesting the sample (Rule 28(4) EPC/Regulation 3.25 of Australia Statutory Rule 1991 No. 71).	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indication listed below will be submitted to the International Bureau Later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only

For International Bureau use only

☐ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received with the International Bureau on:
Authorized officer Doris L. Brock <i>DLB</i> PCT International Division	Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	4185.204-WO	International application to be assigned	PCT/US 95/07536
--	-------------	--	-----------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13 bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>55</u> , line <u>14</u> .	
B. IDENTIFICATION OF Further deposits are identified on an additional sheet ☒	
Name of depository institution Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL)	
Address of depository institution (including postal code and country) Northern Regional Research Center 1815 University Street Peoria, IL 61604, US	
Date of deposit May 25, 1995	Accession Number NRRL B-21265
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
In respect of those designations in which a European and/or Australia Patent is sought, during the pendency of the patent application, a sample of the deposited microorganism is only to be provided to an independent expert nominated by the person requesting the sample (Rule 28(4) EPC/Regulation 3.25 of Australia Statutory Rule 1991 No. 71).	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indication listed below will be submitted to the International Bureau Later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only

☐ This sheet was received with the international application
Authorized officer Doris L. Brock <i>leeb</i> PCT International Division

For International Bureau use only

☐ This sheet was received with the International Bureau on:
Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	4185.204-WO	International application No. to be assigned	PCT/US 95/07536
---	-------------	---	-----------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13 bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page 55, line 16	
B. IDENTIFICATION OF Further deposits are identified on an additional sheet ☒	
Name of depository institution Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL)	
Address of depository institution (including postal code and country) Northern Regional Research Center 1815 University Street Peoria, IL 61604, US	
Date of deposit May 25, 1995	Accession Number NRRL B-21266
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
In respect of those designations in which a European and/or Australia Patent is sought, during the pendency of the patent application, a sample of the deposited microorganism is only to be provided to an independent expert nominated by the person requesting the sample (Rule 28(4) EPC/Regulation 3.25 of Australia Statutory Rule 1991 No. 71).	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indication listed below will be submitted to the International Bureau Later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only

☐ This sheet was received with the international application
Authorized officer Doris L. Brock <i>DLB</i> PCT International Division

For International Bureau use only

☐ This sheet was received with the International Bureau on:
Authorized officer

Applicant's or agent's file reference number	4185204-WO	International application N. to be assigned	PCI/US 95/07536
--	------------	---	-----------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13 bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page <u>55</u> , line <u>18</u>	
B. IDENTIFICATION OF Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depository institution Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL)	
Address of depository institution (including postal code and country) Northern Regional Research Center 1815 University Street Peoria, IL 61604, US	
Date of deposit May 25, 1995	Accession Number NRRL B-21267
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
In respect of those designations in which a European and/or Australia Patent is sought, during the pendency of the patent application, a sample of the deposited microorganism is only to be provided to an independent expert nominated by the person requesting the sample (Rule 28(4) EPC/Regulation 3.25 of Australia Statutory Rule 1991 No. 71).	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indication listed below will be submitted to the International Bureau Later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only

☐ This sheet was received with the international application
Authorized officer <u>Doris L. Brock</u> <i>DLB</i> PCT International Division

For International Bureau use only

☐ This sheet was received with the International Bureau on:
Authorized officer

Patenttivaatimukset

1. DNA-konstruktii, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sekvenssin, joka koodittaa Polyporus-lakkaasia.
- 5 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen konstruktii, t u n n e t -
t u siitä, että se käsittää sekvenssin, joka koodittaa Po-
lyporus pinsitus-lakkaasia.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen konstruktii, t u n n e t -
10 t u siitä, että se käsittää nukleiinihapposekvenssin, joka
koodittaa SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROLLA 2 kuvattua aminohap-
posekvenssiä.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen konstruktii, t u n n e t -
15 t u siitä, että se käsittää SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROLLA 1
kuvatun nukleiinihapposekvenssin.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen konstruktii, t u n n e t -
t u siitä, että se käsittää nukleiinihapposekvenssin, joka
20 koodittaa SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROLLA 4 kuvattua aminohap-
posekvenssiä.
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen konstruktii, t u n n e t -
t u siitä, että se käsittää SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROLLA 3
25 kuvatun nukleiinihapposekvenssin.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen konstruktii, t u n n e t -
t u siitä, että se käsittää nukleiinihapposekvenssin, joka
koodittaa SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROLLA 6 kuvattua aminohap-
30 posekvenssiä.
8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen konstruktii, t u n n e t -
t u siitä, että se käsittää SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROLLA 5
kuvatun nukleiinihapposekvenssin.
35
9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen konstruktii, t u n n e t -
t u siitä, että se käsittää nukleiinihapposekvenssin, joka

koodittaa SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROLLA 8 kuvattua aminohapposekvenssiä.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen konstrukti, t u n -
5 n e t t u siitä, että se käsittää SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROLLA 7 kuvatun nukleiinihapposekvenssin.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen konstrukti, t u n -
n e t t u siitä, että se käsittää nukleiinihapposekvenssin,
10 joka koodittaa SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROLLA 10 kuvattua aminohapposekvenssiä.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen konstrukti, t u n -
n e t t u siitä, että se käsittää SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROLLA 9
15 kuvatun nukleiinihapposekvenssin.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen konstrukti, t u n -
n e t t u siitä, että se käsittää NRRL B-21263:een,
21264:ään, 21265:een, 21266:een, 21267:ään tai 21268:aan
20 sisältyvän nukleiinihapposekvenssin.

14. Oleellisen puhdas Polyporus-lakkaasientsyymi.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen entsyymi, t u n n e t -
25 t u siitä, että se on Polyporus pinsitus-lakkaasi.

16. Patenttivaatimuksen 14 mukainen entsyymi, t u n n e t -
t u siitä, että se käsittää aminohapposekvenssin, joka on
SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROLLA 4, 6, 8 tai 10 kuvattu sek-
30 venssejä, tai sekvenssi, jolla on ainakin noin 80-%:inen homologia sen kanssa.

17. Yhdistelmä-DNA-vektori, t u n n e t t u siitä, että se
käsittää DNA-konstruktin, joka sisältää sekvenssin, joka
35 koodittaa Polyporus-lakkaasia.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen vektori, t u n n e t -
t u siitä, että konstrukti on liittynyt toimintakykyisesti
promoottorisekvenssiin.
- 5 19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen vektori, t u n n e t -
t u siitä, että promoottori on sieni- tai hiivapromoottori.
20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen vektori, t u n n e t -
t u siitä, että promoottori on *Aspergillus oryzae*'n TAKA-
10 amylaasipromoottori.
21. Patenttivaatimuksen 18 mukainen vektori, t u n n e t -
t u siitä, että promoottori on *Aspergillus niger*'in tai *As-*
pergillus awamori'n glukoaamylaasi(*glaA*) -promoottori.
15
22. Patenttivaatimuksen 17 mukainen vektori, t u n n e t -
t u siitä, että se käsittää myös valittavissa olevan mark-
kerin.
- 20 23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen vektori, t u n n e t -
t u siitä, että valittavissa oleva markkeri on *amdS*, *pyrG*,
argB, *niaD*, *sC*, *trpC* tai *hygB*.
24. Patenttivaatimuksen 22 mukainen vektori, t u n n e t -
25 t u siitä, että valittavissa oleva markkeri on *Aspergillus*
nidulans'in tai *Aspergillus oryzae*'n *amdS*-markkeri, tai
Aspergillus nidulans'in, *Aspergillus niger*'in, *Aspergillus*
awamori'n tai *Aspergillus oryzae*'n *pyrG*-markkeri.
- 30 25. Patenttivaatimuksen 18 mukainen vektori, t u n n e t -
t u siitä, että se käsittää sekä *Aspergillus oryzae*'n TAKA-
amylaasipromoottorie että *Aspergillus nidulans*'in tai *Asper-*
gillus oryzae'n *amdS*- tai *pyrG*-markkerin.
- 35 26. Yhdistelmä-DNA-isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että
se käsittää heterologisen DNA-konstruktin, joka sisältää
sekvenssin, joka koodittaa *Polyporus*-lakkaasia.

27. Patenttivaatimuksen 26 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että se on sienisoluu.
28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen solu, t u n n e t t u
5 siitä, että se on Aspergillus-solu.
29. Patenttivaatimuksen 26 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että konstrukti on integroitunut isäntäsolugenomiin.
- 10 30. Patenttivaatimuksen 26 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että konstrukti sisältyy vektoriin.
31. Patenttivaatimuksen 26 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että se käsittää konstruktin, joka sisältää sekvenssin, joka koodittaa aminohapposekvenssiä, joka on SEKVENSSINTUNNISTUSNUMEROLLA 2, 4, 6, 8 tai 10 kuvattu.
15
32. Menetelmä lakkaasientsyymien saamiseksi, t u n n e t t u siitä, että yhdistelmä-DNA-isäntäsolua, joka käsittää DNA-konstruktin, joka sisältää nukleiinihapposekvenssin, joka koodittaa Polyporus-lakkaasientsyymiä, kasvatetaan olosuhteissa, jotka johtavat entsyymien ekspressioon, ja otetaan entsyymi talteen viljelmästä.
20
33. Menetelmä lakkaasientsyymien saamiseksi, t u n n e t t u siitä, että Aspergillus-yhdistelmä-DNA-isäntäsolua, joka käsittää DNA-konstruktin, joka sisältää nukleiinihapposekvenssin, joka koodittaa Polyporus-tyypistä lakkaasientsyymiä, kasvatetaan olosuhteissa, jotka johtavat entsyymien ekspressioon, ja otetaan entsyymi talteen viljelmästä.
25
30
34. Polyporus-entsyymi, t u n n e t t u siitä, että se on saatu patenttivaatimuksen 33 mukaisella menetelmällä.
35. Menetelmä liuoksessa olevan ligniini- tai ligniinisulfaattisubstraatin polymeroimiseksi, t u n n e t t u siitä,

että substraatti saatetaan kontaktiin Polyporus-lakkaasin kanssa.

36. Menetelmä Kraftmassan in situ-depolymerointiin, t u n -
5 n e t t u siitä, että massa saatetaan kontaktiin Polyporus-lakkaasin kanssa.

37. Menetelmä värien tai väriprekursorien hapettamiseksi,
t u n n e t t u siitä, että väri tai väriprekursori saate-
10 taan kontaktiin Polyporus-lakkaasin kanssa.

38. Menetelmä hiusten värjäämiseksi, t u n n e t t u sii-
tä, että Polyporus-lakkaasia saatetaan ainakin yhden modi-
fioijan läsnä ollessa tai ilman modifioijaa kontaktiin aina-
15 kin yhden väriprekursorin kanssa ajaksi ja olosuhteissa,
jotka riittävät väriprekursorin hapettamiseen väriksi.

39. Patenttivaatimuksen 38 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että väriprekursori on diamiinia, aminofe-
20 nolia tai fenolia.

40. Patenttivaatimuksen 38 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että modifioija, käytettäessä, on meta-
damiinia, meta-aminofenolia tai polyfenolia.

25

41. Patenttivaatimuksen 38 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että väriprekursori on primääristä väli-
tuotetta, joka on orto- tai para-diamiinia tai aminofenolia.

30 42. Patenttivaatimuksen 38 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että käytetään useampaa kuin yhtä väripre-
kursoria.

43. Patenttivaatimuksen 38 mukainen menetelmä, t u n -
35 n e t t u siitä, että käytetään useampaa kuin yhtä modi-
fioijaa.

44. Patenttivaatimuksen 38 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että käytetään sekä primääristä väli-
tuotetta että modifioijaa.

5 45. Värikoostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää
Polyporus-lakkaasia yhdistettynä ainakin yhden väriprekurso-
rin kanssa.

46. Värikoostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää
10 Polyporus-lakkaasia yhdistettynä ainakin yhden primäärisen
välituotteen ja ainakin yhden modifioijan kanssa.

47. Astia, t u n n e t t u siitä, että se sisältää väri-
koostumusta, joka käsittää Polyporus-lakkaasia ja ainakin
15 yhtä väriprekursoria hapettomassa ilmakehässä.

48. Patenttivaatimuksen 47 mukainen astia, t u n n e t t u
siitä, että se sisältää ainakin yhtä primääristä välituote-
väriprekursoria yhdistettynä ainakin yhden modifioijan kans-
20 sa.

49. Menetelmä fenoli- tai aniliiniyhdisteen polymeroimiseksi
tai hapettamiseksi, t u n n e t t u siitä, että fenoli-
tai aniliiniyhdiste saatetaan kontaktiin Polyporus-lakkaasin
25 kanssa.

10 20 30 40 50 60 70

AGATTCTGA CACCGGTGCA ATCTTGACAC TGTACCAACC GGGCAAGTCT CGTCCTTGGT TCTCGGGGAC

80 90 100 110 120 130 140

TGGCGCCGGT CGCTACCCCT TGGTCATTCA CTCTACCAGA GCGCTGGCTT CGCCGAGGIA TAAAGGATGT

150 160 170 180 190 200 210

TGGCGGACAC CCTCAACACC CCAACTCAAG CCCCACTTGA GCTTTTGGGA GATCCTCCAC ATACCACTCA

220 230 239 248 257 266

CTACTTTCAA GTTCTTCAAC [>] ATG TCG AGG TTT CAC TCT CTT CTC GCT TTC GTC GTT

Met Ser Arg Phe His Ser Leu Leu Ala Phe Val Val

275 284 293 302 311 320

GCT TCC CTT ACG GCT GTG GCC CAC GCT GGT ATC GGT CCC GTC GCC GAC CTA ACC

Ala Ser Leu Thr Ala Val Ala His Ala Gly Ile Gly Pro Val Ala Asp Leu Thr

329 338 347 356 365 374

ATC ACC AAC GCA GCG GTC AGC CCC GAC GGG TTT TCT CGC CAG GCC GTC GTC GTG

Ile Thr Asn Ala Ala Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser Arg Gln Ala Val Val Val

383 392 401 410 423 433

AAC GGC GGC ACC CCT GGC CCT CTC ATC ACG GGT AAC ATG GTTCGTCTCG GCTCGCACTA

Asn Gly Gly Thr Pro Gly Pro Leu Ile Thr Gly Asn MET

443 453 463 473 482 491

GGGGTTTGTA TCGTTCTCTGA CGTTGTTGGA G GGG GAT CGC TTC CAG CTC AAT GTC ATC

Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Ile

500 509 518 527 543 553

GAC AAC CTT ACC AAC CAC ACG ATG GTG AAG AGC ACG AGT ATT GTGAGCTGCT ATTTCTCCGG

Asp Asn Leu Thr Asn His Thr MET Val Lys Ser Thr Ser Ile

FIG. 1A
1 / 38

563	573	583	592	601	610												
ACGGGGCTTC ATTGTGCTAA TAATCGTCGT GTGCAG			CAC	TGG	CAC	GGT	TTC	TTC	CAG	AAG							
			His	Trp	His	Gly	Phe	Phe	Gln	Lys							
619	628	637	646	655	664												
GGT	ACC	AAC	TGG	GCC	GAC	GGT	CCC	GCC	TTC	ATC	AAC	CAG	TGC	CCG	ATC	TCA	TCT
Gly	Thr	Asn	Trp	Ala	Asp	Gly	Pro	Ala	Phe	Ile	Asn	Gln	Cys	Pro	Ile	Ser	Ser
673	682	691	700	709	720												
GGT	CAC	TCG	TTC	CTG	TAC	GAC	TTC	CAG	GTT	CCT	GAC	CAG	GCT	G	GTAAGTACGG		
Gly	His	Ser	Phe	Leu	Tyr	Asp	Phe	Gln	Val	Pro	Asp	Gln	Ala	Gly			
730	740	750	760	770	779												
TCGTTATGGA GTATACTGCG			CATTGCTAAA	CCACATGGTG	AACAG	GT	ACC	TTC	TGG	TAT							
							Thr	Phe	Trp	Tyr							
788	797	806	815	824	833												
CAC	AGT	CAC	TTG	TCT	ACG	CAG	TAC	TGT	GAT	GGT	TTG	AGG	GGT	CCG	TTC	GTT	GTT
His	Ser	His	Leu	Ser	Thr	Gln	Tyr	Cys	Asp	Gly	Leu	Arg	Gly	Pro	Phe	Val	Val
842	851	860	869	878	889												
TAC	GAC	CCG	AAT	GAC	CCG	GCC	GCC	GAC	CTG	TAC	GAC	GTC	GAC	AAC	G	GTAAGGACGA	
Tyr	Asp	Pro	Asn	Asp	Pro	Ala	Ala	Asp	Leu	Tyr	Asp	Val	Asp	Asn	Asp		
899	909	919	929	940	949												
ATTCGAACCG TAAATACTTG			CTTACTGATA	CTTCTCGATG	AATTAG	AC	GAC	ACT	GTC	ATT							
							Asp	Thr	Val	Ile							
958	967	976	985	994	1009												
ACC	CTT	GTG	GAT	TGG	TAC	CAC	GTC	GCC	GCG	AAG	CTG	GCG	GGG	GCA	TTC	CC	GTAAGTCCAT
Thr	Leu	Val	Asp	Trp	Tyr	His	Val	Ala	Ala	Lys	Leu	Gly	Pro	Ala	Phe	Pro	

FIG.1B

1019	1029	1039	1049	1060	1069
GAGTATTCTG CTGTTGAATC TGTCTTAACT			GTGCATATCA G T	CTC GGC GCC GAC GCC ACC	
				Leu Gly Ala Asp Ala Thr	
1078	1087	1096	1105	1114	1123
CTC ATC AAC GGT AAG GGA CGC TCC CCC AGC ACG ACC ACC GCG GAC CTC TCA GTT					
Leu Ile Asn Gly Lys Gly Arg Ser Pro Ser Thr Thr Thr Ala Asp Leu Ser Val					
1132	1141	1156	1166	1176	1186
ATC AGC GTC ACC CCG GGT AAA CG		GTATGCTATA TCTTATCTTA TCTGATGGCA TTTCTCTGAG			
Ile Ser Val Thr Pro Gly Lys Arg					
1196	1207	1216	1225	1234	
ACATTCTCCA G C TAC CGT TTC CGC CTG GTG TCC CTG TCG TGC GAC CCC AAC TAC					
	Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Leu Ser Cys Asp Pro Asn Tyr				
1243	1252	1261	1270	1279	1288
ACG TTC AGC ATC GAT GGT CAC AAC ATG ACG ATC ATC GAG ACC GAC TCA ATC AAC					
Thr Phe Ser Ile Asp Gly His Asn MET Thr Ile Ile Glu Thr Asp Ser Ile Asn					
1297	1306	1315	1324	1333	1342
ACC GCG CCC CTC GTC GTC GAC TCC ATT CAG ATC TTC GCC CCC CAG CGT TAC TGC					
Thr Ala Pro Leu Val Val Asp Ser Ile Gln Ile Phe Ala Ala Gln Arg Tyr Ser					
1351	1364	1374	1384	1394	1404
TTC GTG GTAAGTTCGA TTCATCCTCT AACGTTGGTC GCTGTTAGTG ATCGTATCGT CATGTAG					
Phe Val					
1414	1423	1432	1441	1450	1459
CTC GAG GCC AAC CAG GCC GTC GAC AAC TAC TGG ATT CGC GCC AAC CCG AAC TTC					
Leu Glu Ala Asn Gln Ala Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Asn Pro Asn Phe					

FIG.1C

1468	1477	1486	1495	1504	1513
GGT AAC GTC GGG TTC ACC GGC GGC ATT AAC TCG GCT ATC CTC CGC TAC GAT GGT					
Gly Asn Val Gly Phe Thr Gly Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Asp Gly					
1522	1531	1540	1549	1558	1567
GCC GCT GCC GTG GAG CCC ACC ACA ACG CAA ACC ACG TCG ACT GCG CCG CTC AAC					
Ala Ala Ala Val Glu Pro Thr Thr Thr Gln Thr Thr Ser Thr Ala Pro Leu Asn					
1576	1585	1594	1603	1619	1629
GAG GTC AAC CTG CAC CCG CTG GTT ACC ACC GCT GTG GTATGTAATA TTGTCGGTAA					
Glu Val Asn Leu His Pro Leu Val Thr Thr Ala Val					
1639	1649	1659	1669	1678	1687
TGTAATACAT TGTTGCTGAC CTCGACCCCC ACAG CCT GGC TCG CCC GTC GCT GGT GGT					
			Pro Gly Ser Pro Val Ala Gly Gly		
1696	1705	1714	1723	1732	1741
GTC GAC CTG GCC ATC AAC ATG GCG TTC AAC TTC AAC GGC ACC AAC TTC TTC ATC					
Val Asp Leu Ala Ile Asn MET Ala Phe Asn Phe Asn Gly Thr Asn Phe Phe Ile					
1750	1759	1768	1777	1786	1795
AAC GGC ACG TCT TTC ACG CCC CCG ACC GTG CCT GTC CTG CTC CAG ATC ATC AGC					
Asn Gly Thr Ser Phe Thr Pro Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Ile Ser					
1804	1813	1822	1831	1840	1849
GGC GCG CAG AAC GCG CAG GAC CTC CTG CCC TCC GGT AGC GTC TAC TCG CTT CCC					
Gly Ala Gln Asn Ala Gln Asp Leu Leu Pro Ser Gly Ser Val Tyr Ser Leu Pro					
1858	1867	1876	1885	1894	1903
TCG AAC GCC GAC ATC GAG ATC TCC TTC CCC GCC ACC GCC GCC GCC CCC GGT GCG					
Ser Asn Ala Asp Ile Glu Ile Ser Phe Pro Ala Thr Ala Ala Ala Pro Gly Ala					

1912	1921	1930	1939	1948	1957	
CCC CAC CCC TTC CAC TTG CAC GGG CAC GCG TTC GCG GTC GTC CCG AGC GCC GGC						
Pro His Pro Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly						
1966	1975	1984	1993	2002	2011	
AGC ACG GT TAC AAC TAC GAC AAC CCC ATC TTC CCG GAC TC GTC AGC ACG GGC						
Ser Thr Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser Thr Gly						
2020	2029	2038	2047	2056	2065	
ACG CCT GCG GCC GGT GAC AAC GTC ACC ATC CCG TTC CCG ACC GAC AAC CCC GGC						
Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Arg Thr Asp Asn Pro Gly						
2074	2083	2092	2101	2110	2119	
CCG TGG TTC CTC CAC TGC CAC ATC GAC TTC CAC CTC GAG GCC GGC TTC GCC GTC						
Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Glu Ala Gly Phe Ala Val						
2128	2137	2146	2155	2164	2173	
GTG TTC GCG GAG GAC ATC CCC GAC GTC GCG TCG CCG AAC CCC GTC CCC CAG GCG						
Val Phe Ala Glu Asp Ile Pro Asp Val Ala Ser Ala Asn Pro Val Pro Gln Ala						
2182	2191	2200	2209	2218	2231	
TGG TCC GAC CTC TGT CCG ACC TAC GAC GCG CTC GAC CCG AGC GAC CAG TAAATGGCTT						
Trp Ser Asp Leu Cys Pro Thr Tyr Asp Ala Leu Asp Pro Ser Asp Gln						
2241	2251	2261	2271	2281	2291	2301
GCGCCGGTCG ATGATACGAT ATGGACGGTG AGTTCGCACT TGCAATACGG ACTCTCGCCT CATTATGGTT						
2311	2321	2331	2341	2351	2361	2371
ACACACTCGC TCTGGATCTC TCGCCTGTGG ACAGAACAAA CTGTGATAAT TCGCTTAATG GTTGAAACAA						
2381	2391	2401	2411			
ATGGAATATT GGGGTACTAT GCACGCATCT CGCTGGGTGA GCTTTCGT						

FIG.1E
5 / 38

10	20	30	40	50	60	70
CGGGCGCACA AACCGTGGGA GCCAACACAC TCCCGTCCAC TCTCACACTG GCCAGATTCTG CGCGACCGCC						
80	90	100	110	120	130	140
GCCTTTCAGG CCCAAACAGA TCTGGCAGGT TTCGATGGCG CACGCCGCCG TGCCTGCCGG ATTCAATTGT						
150	160	170	180	190	200	210
GCGCCAGTCG GGCATCCGGA TGGCTCTACC AGCGCGGTG ACTGGAAGAG AACACCGAGG TCATGCATTC						
220	230	240	250	260	270	280
TGGCCAAGTG CGGCCAAAGG ACGGCTCGCT GGTGCGGATA CTTAAAGGGC GCGCGCGGA GGCCTGTCTA						
290	300	310	320	330	340	350
CCAAGCTCAA GCTCGCCTTG GGTTCCTAGT CTCCGCCACC CTCCTCTTCC CCCACACAGT CGCTCCATAG						
360	369	378	387	396	405	
CACCGTCGGC GCC > ATG GGT CTG CAG CGA TTC AGC TTC TTC GTC ACC CTC GCG CTC						
MET Gly Leu Gln Arg Phe Ser Phe Phe Val Thr Leu Ala Leu						
414	423	432	441	450	459	
GTC GCT CGC TCT CTT GCA GCC ATC GGG CCG GTG GCG AGC CTC GTC GTC GCG AAC						
Val Ala Arg Ser Leu Ala Ala Ile Gly Pro Val Ala Ser Leu Val Val Ala Asn						
468	477	486	495	504	513	
GCC CCC GTC TCG CCC GAC GGC TTC CTT CGG GAT GCC ATC GTG GTC AAC GGC GTG						
Ala Pro Val Ser Pro Asp Gly Phe Leu Arg Asp Ala Ile Val Val Asn Gly Val						
522	531	540	553	563	573	
GTC CCT TCC CCG CTC ATC ACC GGG AAG AAG						
Val Pro Ser Pro Leu Ile Thr Gly Lys Lys						

FIG.2A

583	592	601	610	619	628
TGCTGACAGC GATCTACAG GGA GAC CGC GTC CAG CTC AAC GTC GTC GAC ACC TTG					
Gly Asp Arg Phe Gln Leu Asn Val Val Asp Thr Leu					
637	646	655	671	681	691
ACC AAC CAC AGC ATG CTC AAG TCC ACT AGT ATC GTAAGTGTGA CGATCCGAAT GTGACATCAA					
Thr Asn His Ser MET Leu Lys Ser Thr Ser Ile					
701	711	721	730	739	748
TCGGGGCTAA TTAACCGCGC ACAG CAC TGG CAC GGC TTC TTC CAG GCA GGC ACC AAC					
His Trp His Gly Phe Phe Gln Ala Gly Thr Asn					
757	766	775	784	793	802
TGG GCA GAA GGA CCC GCG TTC GTC AAC CAG TGC CCT ATT GCT TCC GGG CAT TCA					
Trp Ala Glu Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys Pro Ile Ala Ser Gly His Ser					
811	820	829	846	856	
TTC CTG TAC GAC TTC CAT GTG CCC GAC CAG GCA G GTAAGCAGGA TTTTCTGGGG					
Phe Leu Tyr Asp Phe His Val Pro Asp Gln Ala Gly					
866	876	886	896	905	914
TCCCCGTGTG ATGCAATGTT CTCATGCTCC GACGTGATCG ACAG GG ACG TTC TGG TAC CAC					
Thr Phe Trp Tyr His					
923	932	941	950	959	968
AGT CAT CTG TCT ACG CAG TAC TGT GAC GGG CTG CGG GGG CCG TTC GTC GTG TAC					
Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro Phe Val Val Tyr					
977	986	995	1004	1013	1024
GAC CCC AAG GAC CCG CAC GCC AGC CGT TAC GAT GTT GAC AAT G GTACGTGCGC					
Asp Pro Lys Asp Pro His Ala Ser Arg Tyr Asp Val Asp Asn Glu					

FIG.2B

7 / 38

1034	1044	1054	1064	1075	1084
CACGGAGTAT ATCACACAGC ATGCGTTGAC GTCGGGCCAA CAGAG				ACC	ACG GTC ATC ACC
				Ser Thr Val	Ile Thr
1093	1102	1111	1120	1129	1141
TTG	ACC GAC TGG	TAC CAC ACC	GCT GCC CCG CTC	GGT CCC AAG	TTC CC GTAAGCTCGC
Leu Thr Asp Trp Tyr His Thr Ala Ala Arg Leu Gly Pro Lys Phe Pro					
1151	1161	1171	1181	1190	1199
AATGGCTTAG TGTTACAGG TTCTTTGCTT ATGTTGCTTC GATAG				A	CTC GGC GCG GAC GCC
				Leu Gly Ala Asp Ala	
1208	1217	1226	1235	1244	1253
ACG CTC ATC AAC	GGT CTG GGG CCG	TCT GCC TCC ACT	CCC ACC GCT GCG	CTT GCC	
Thr Leu Ile Asp Gly Leu Gly Arg Ser Ala Ser Thr Pro Thr Ala Ala Leu Ala					
1262	1271	1280	1292	1302	1312
GTG ATC AAC GTC	CAG CAC GGA AAG	CG	GTGAGCATTG	TCTTGATGC	CATTCAATG
Val Ile Asn Val Gln His Gly Lys Arg					
1322	1332	1341	1351	1360	1369
CTTTGTGCTG ACCTATCGGA ACCGCGCAG				C	TAC CCG TTC CGT CTC GTT TCG ATC TCG
				Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Ile Ser	
1378	1387	1396	1405	1414	1423
TGT GAC CCG AAC	TAC ACG TTC AGC	ATC GAC GGG CAC	AAC CTG ACC GTC	ATC GAG	
Cys Asp Pro Asn Tyr Thr Phe Ser Ile Asp Gly His Asn Leu Thr Val Ile Glu					
1432	1441	1450	1459	1468	1477
GTC GAC GGC ATC	AAT AGC CAG CCT	CTC CTT GTC GAC	TCT ATC CAG ATC	TTC GCC	
Val Asp Gly Ile Asn Ser Gln Pro Leu Leu Val Asp Ser Ile Gln Ile Phe Ala					
1486	1495	1508	1518	1528	1538
GCA CAG CGC TAC	TCC TTC GTG	GTAAGTCCTG	GCTTGTCGAT	GCTCCAAAGT	GGCCTCACTC
Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val					

1548	1559	1568	1577	1586		
ATATACTTTC	GTTAG	TTG AAT GCG AAT CAA ACC GTG GGC AAC TAC TGG GTT CGT				
		Leu Asn Ala Asn Gln Thr Val Gly Asn Tyr Trp Val Arg				
1595	1604	1613	1622	1631	1640	
GCG AAC CCG AAC TTC GGA ACG GTT GGG TTC GCC GGG GGG ATC AAC TCC GCC ATC						
Ala Asn Pro Asn Phe Gly Thr Val Gly Phe Ala Gly Gly Ile Asn Ser Ala Ile						
1649	1658	1667	1676	1685	1694	
TTG CGC TAC CAG GGC GCA CCG GTC GCC GAG CCT ACC ACG ACC CAG ACG CCG TCG						
Leu Arg Tyr Gln Gly Ala Pro Val Ala Glu Pro Thr Thr Thr Gln Thr Pro Ser						
1703	1712	1721	1730	1739	1748	1761
GTG ATC CCG CTC ATC GAG ACG AAC TTG CAC CCG CTC GCG CGC ATG CCA GTG GTATGTCTCT						
Val Ile Pro Leu Ile Glu Thr Asn Leu His Pro Leu Ala Arg MET Pro Val						
1771	1781	1791	1801	1811	1821	
TTTTCTGATC ATCTGAGTTG CCGTTGTTG ACCGCATTAT GTGTTACTAT CTAG CCT GGC AGC						
					Pro Gly Ser	
1830	1839	1848	1857	1866	1882	
CCG ACA CCC GGG GGC GTC GAC AAG GCG CTC AAC CTC GCG TTT AAC TTC GTAAGTATCT						
Pro Thr Pro Gly Gly Val Asp Lys Ala Leu Asn Leu Ala Phe Asn Phe						
1892	1902	1912	1922	1931	1940	
CTACTACTT GGCTGGAGGC TGGTCGCTGA TCATACGGTG CTTACAG AAC GGC ACC AAC TTC						
				Asn Gly Thr Asn Phe		
1949	1958	1967	1976	1985	1994	
TTC ATC AAC AAC GCG ACT TTC ACG CCG CCG ACC GTC CCG GTA CTC CTC CAG ATT						
Phe Ile Asn Asn Ala Thr Phe Thr Pro Pro Thr Val Pro Val Leu Leu Gln Ile						

FIG.2D

2003	2012	2021	2030	2039	2048
CTG AGC GGT GCG CAG ACC GCA CAA GAC CTG CTC CCC GCA GGC TCT GTC TAC CCG					
Leu Ser Gly Ala Gln Thr Ala Gln Asp Leu Leu Pro Ala Gly Ser Val Tyr Pro					
2057	2066	2075	2084	2093	2102
CTC CCG GCC CAC TCC ACC ATC GAG ATC ACC CTG CCC GCG ACC GCC TTG GCC CCG					
Leu Pro Ala His Ser Thr Ile Glu Ile Thr Leu Pro Ala Thr Ala Leu Ala Pro					
2111	2120	2129		2145	2155
GGT GCA CCG CAC CCC TTC CAC CTG CAC GGT GTATGTTCCC CTGCCTTCCC TTCTTATCCC					
Gly Ala Pro His Pro Phe His Leu His Gly					
2175	2185	2195	2204	2213	2222
CGAACCAGTG CTCACGTCCG TCCCATCTAG CAC GCC TTC GCG GTC GTT CGC AGC GCG					
			His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala		
2231	2240	2249	2258	2267	2276
GGG AGC ACC ACG TAT AAC TAC AAC GAC CCG ATC TTC CCG GAC GTC GTG AGC ACG					
Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser Thr					
2285	2294	2303	2312	2321	2330
GGC ACG CCC GCC GCG GGC GAC AAC GTC ACG ATC CCG TTC CAG ACG GAC AAC CCC					
Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Gln Thr Asp Asn Pro					
2339	2348	2357	2366	2375	2384
GGG CCG TGG TTC CTC CAC TGG CAC ATC GAC TTC CAC CTC GAC GCA GGC TTC GCG					
Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Asp Ala Gly Phe Ala					
2393	2402	2411	2420	2429	2438
ATC GTG TTC GCA GAG GAC GTT GCG GAC GTG AAG GCG GCG AAC CCG GTT CCG AAG					
Ile Val Phe Ala Glu Asp Val Ala Asp Val Lys Ala Ala Asn Pro Val Pro Lys					

FIG.2E

10 / 38

2447	2456	2465	2474	2483		2499											
GGC	TGG	TCG	GAC	CTG	TGC	CCG	ATC	TAC	GAG	GGG	CTG	AGC	GAG	GCT	AAC	CAG	→
Ala	Trp	Ser	Asp	Leu	Cys	Pro	Ile	Tyr	Asp	Gly	Leu	Ser	Glu	Ala	Asn	Gln	TGAGCGGAGG
2509	2519	2529	2539	2549	2559	2569											
GCGTGGTGTG GAGCGTAAAG CTCGCCGCTC CACCTGGGGG GTTGAAGGTG TTCTGATTGA AATGGTCTTT																	
2579	2589	2599	2609	2619	2629	2639											
GGGTTTATTT GTTGTTATTC TAACTCGGTT CTCTACGCAA GGACCGAGGA TTGTATAGGA TGAAGTAACT																	
2649	2659	2669	2679	2689													
TTCCTAATGT ATTATGATAT CAATTGACGG AGGCATGGAC TCCGAAGTGT																	

FIG.2F

10 20 30 40 50 60 70
 TTTCCCGACT AAACCAATCT CAGNCCGCTT CCTCCTAGGG AACCGAGCGA TGTGGCGGCC CTCTCTATCC
 80 90 100 110 120 130 140
 AAGCTGTCCA TAAGAAGACG TTCAAATGCC GCAGCAAGCG AGGAAATAAG CATCTAACAG TGTTTTCC
 150 160 170 180 190 200 210
 ATAGTCGCAT TTGCGCCGCC TGTCGGACCG ACGCCCCTAG AGCGCTTTGG GAAACGTCCG AAGTGGCGCG
 220 230 240 250 260 270 280
 TGTATTTCGT GTAGACGAGA CGGTATTTGT CTCATCATTC CCGTGCTTCA GGTGACACA GCCCAAAGGT
 290 300 310 320 330 340 350
 CTATGTACGG CCCTTCACAT TCCCTGACAC ATTGACGCAA CCCTCGGTGC GCCTCCGACA GTGCCTCGGT
 360 370 380 390 400 410 420
 TGTAGTATCG GGACGCCCTA GGATGCAAGA TTGGAAGTCA CCAAGGCCCG AAGGGTATAA AATACCGAGA
 430 440 450 460 470 480
 GGTCTACCA CTTCTGCATC TCCAGTCGCA GAGTTCCTCT CCCTTGCCAG CCACAGCTCG AG
 491 500 509 518 527 536
 > ATG TCC TTC TCT AGC CTT CGC CGT GCC TTG GTC TTC CTG GGT GCT TGC AGC AGT
 MET Ser Phe Ser Ser Leu Arg Arg Ala Leu Val Phe Leu Gly Ala Cys Ser Ser
 545 554 563 572 581 590
GCG CTG GCC TCC ATC GGC CCA GTC ACT GAG CTC GAC ATC GTT AAC AAG GTC ATC
 Ala Leu Ala Ser Ile Gly Pro Val Thr Glu Leu Asp Ile Val Asn Lys Val Ile
 599 608 617 626 635 644
GCC CCG GAT GGC GTC GCT CGT GAT ACA GTC CTC GCC GGG GGC ACG TTC CCG GGC
 Ala Pro Asp Gly Val Ala Arg Asp Thr Val Leu Ala Gly Gly Thr Phe Pro Gly
 653 662 675 685 695 705
CCA CTC ATC ACA GGA AAG AAG GTATGCTAAG TAGTCCCGCC CCCATCATCC TGTGGCTGAC
 Pro Leu Ile Thr Gly Lys Lys

FIG.3A

1165	1175	1185	1198	1207	
AAAACGGTTA ACTTCTAATT CTGTAAATAT CTTCATAG			AG	AGC	ACC GTT ATC ACT CTG
			Ser	Thr	Val Ile Thr Leu
1216	1225	1234	1243	1252	1267
GCA	GAC TGG TAC CAT	ACC CCG GCG CCT	CTG CTG CCG CCT	GCC GC	GTACGCCTCC
Ala	Asp Trp Tyr His Thr	Pro Ala Pro Leu	Leu Pro Pro Ala	Ala	
1277	1287	1297	1307	1317	1328
ACACATCTGC ACAGCGTTCC GTATCTCATA CCCTTAAAGT TTATCGGACA G C					ACT TTG ATT
					Thr Leu Ile
1337	1346	1355	1364	1373	1382
AAT	GGC CTG GGT CCG TGC	CCT GGC AAC CCC	ACC GCC GAC CTA	GCC GTC ATC GAA	
Asp	Gly Leu Gly Arg Trp	Pro Gly Asn Pro Thr	Ala Asp Leu Ala	Val Ile Glu	
1391	1409	1419	1429	1439	1449
GTC	CAG CAC GGA AAG CG	GTATGTCATA GCTCGGTTAT	CTATTCATAC TCGCGGCCTC	GAAGCTAAAA	
Val	Gln His Gly Lys Arg				
1459	1470	1479	1488	1497	
CCTTGTTCCA G C		TAC CCG TTC CGA CTG	GTC AGC ACC TCA TGC	GAC CCC AAC TAC	
		Tyr Arg Phe Arg Leu	Val Ser Thr Ser	Cys Asp Pro Asn Tyr	
1506	1515	1524	1533	1542	1551
AAC	TTC ACT ATC GAT GGC	CAC ACC ATG ACA ATC	ATC GAG GCG GAT GGG	CAG AAC	
Asn	Phe Thr Ile Asp Gly His	Thr MET Thr Ile Ile	Glu Ala Asp Gly	Gln Asn	
1560	1569	1578	1587	1596	1605
ACC	CAG CCA CAC CAA GTC	GAC GGA CTT CAG ATC	TTC GCG GCA CAG CGG	TAC TCC	
Thr	Gln Pro His Gln Val	Asp Gly Leu Gln Ile	Phe Ala Ala Gln Arg	Tyr Ser	

FIG.3C

1614	1627	1637	1647	1657	1667	
<u>TTC</u> <u>GTT</u> <u>GTATGTTTTC</u> <u>CGCATTTCGG</u> <u>GAAAAGGAAT</u> <u>TCCGCTGACA</u> <u>GCTCGAGTGT</u> <u>GCGTAG</u> Phe Val						
1676	1685	1694	1703	1712	1721	
<u>CTT</u> <u>AAC</u> <u>GCT</u> <u>AAC</u> <u>CAA</u> <u>GCG</u> <u>GTC</u> <u>AAC</u> <u>AAC</u> <u>TAC</u> <u>TGG</u> <u>ATC</u> <u>CGT</u> <u>GCG</u> <u>AAC</u> <u>CCT</u> <u>AAC</u> <u>CGT</u> Leu Asn Ala Asn Gln Ala Val Asn Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Asn Pro Asn Arg						
1730	1739	1748	1757	1766	1775	
<u>GCT</u> <u>AAC</u> <u>ACT</u> <u>ACG</u> <u>GGC</u> <u>TTC</u> <u>GCC</u> <u>AAC</u> <u>GGC</u> <u>ATC</u> <u>AAC</u> <u>TCC</u> <u>GCC</u> <u>ATC</u> <u>CTG</u> <u>CGC</u> <u>TAC</u> <u>AAG</u> Ala Asn Thr Thr Gly Phe Ala Asn Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Lys						
1784	1793	1802	1811	1820	1829	
<u>GGG</u> <u>GCG</u> <u>CCG</u> <u>ATT</u> <u>AAG</u> <u>GAG</u> <u>CCT</u> <u>ACG</u> <u>ACG</u> <u>AAC</u> <u>CAG</u> <u>ACT</u> <u>ACC</u> <u>ATC</u> <u>CGG</u> <u>AAC</u> <u>TTT</u> <u>TTG</u> Gly Ala Pro Ile Lys Glu Pro Thr Thr Asn Gln Thr Thr Ile Arg Asn Phe Leu						
1838	1847	1856	1865	1874	1884	1894
<u>TGG</u> <u>GAG</u> <u>ACG</u> <u>GAC</u> <u>TTG</u> <u>CAC</u> <u>CCG</u> <u>CTC</u> <u>ACT</u> <u>GAC</u> <u>CCA</u> <u>CGT</u> <u>GCA</u> <u>GTAAGTTCTA</u> <u>CACAGTCACC</u> Trp Glu Thr Asp Leu His Pro Leu Thr Asp Pro Arg Ala						
1904	1914	1924	1933	1942	1951	
<u>AACGGTGAGC</u> <u>TGTTGTCTGA</u> <u>TTGCACTGTG</u> <u>TTATAG</u> <u>CCT</u> <u>GGC</u> <u>CTT</u> <u>CCT</u> <u>TTC</u> <u>AAG</u> <u>GGG</u> <u>GGC</u> Pro Gly Leu Pro Phe Lys Gly Gly						
1960	1969	1978	1987	1997	2007	2017
<u>GTT</u> <u>GAC</u> <u>CAC</u> <u>GCT</u> <u>TTG</u> <u>AAC</u> <u>CTC</u> <u>AAC</u> <u>CTC</u> <u>ACT</u> <u>TTC</u> <u>GTACGTAGCG</u> <u>CCTCAGATAT</u> <u>CGAGTAGTCT</u> Val Asp His Ala Leu Asn Leu Asn Leu Thr Phe						
2027	2037	2046	2055	2064	2073	
<u>ATCTCCTGAC</u> <u>CGATTGACAC</u> <u>AAT</u> <u>CCA</u> <u>TCG</u> <u>GAG</u> <u>TTC</u> <u>TTC</u> <u>ATC</u> <u>AAC</u> <u>GAT</u> <u>GCC</u> <u>CCT</u> <u>TTC</u> Asn Gly Ser Glu Phe Phe Ile Asn Asp Ala Pro Phe						

FIG.3D

2082	2091	2100	2109	2118	2127
GTC CCT CCG ACT	GTC CCG GTG CTA CTG CAG	ATC CTG AAC GGA	ACG CTC GAC GCG		
Val Pro Pro Thr	Val Pro Val Ieu Leu Gln	Ile Leu Asn Gly	Thr Leu Asp Ala		
2136	2145	2154	2163	2172	2181
AAC GAC CTC CTG	CCG CCC GGC AGC	GTG TAC AAC CTT	CCT CCG GAC TCC	ACC ATC	
Asn Asp Leu Leu	Pro Pro Gly Ser	Val Tyr Asn Leu	Pro Pro Asp Ser	Thr Ile	
2190	2199	2208	2217	2226	2235
GAG CTG TCC ATT	CCC GGA GGT GTG	ACG GGT GGC CCG	CAC CCA TTC CAT	TTG CAC	
Glu Leu Ser Ile	Pro Gly Gly Val	Thr Gly Gly Pro	His Pro Phe His	Leu His	
2248	2258	2268	2278	2288	2297
CGG GTAATAATCT CTCTTTATAC TTTGGTCTCC CGATGCTGAC TTTCAC TGCT CATCTTCAG					
Gly					
2306	2315	2324	2333	2342	2351
CAC GCT TTC TCC	GTC GTG CGT AGC	GCC GGC AGC ACC	GAA TAC AAC TAC	GCG AAC	
His Ala Phe Ser	Val Val Arg Ser	Ala Gly Ser Thr	Glu Tyr Asn Tyr	Ala Asn	
2360	2369	2378	2387	2396	2405
CCG GTG AAG CGC	GAC ACG GTG AGC	ATT GGT CTT GCG	GGC GAC AAC GTC	ACC GTG	
Pro Val Lys Arg	Asp Thr Val Ser	Ile Gly Leu Ala	Gly Asp Asn Val	Thr Val	
2414	2424	2434	2444	2454	2464
CGC TTC GTG GTATGTTTTA CAGCCTCTCT ATCTCCGTGG GCGTTCGGAA GTTGACTGGG CGCGTAG					
Arg Phe Val					
2474	2483	2492	2501	2510	2519
ACC GAC AAC CCC	GGC CCG TGG TTC	CTC CAC TGT CAC	ATC GAC TTC CAT	TTG CAA	
Thr Asp Asn Pro	Gly Pro Trp Phe	Leu His Cys His	Ile Asp Phe His	Leu Gln	

FIG.3E

2528 2537 2546 2555 2564 2573
 GCA GGC CTC GCC ATC GTG TTC GCG GAG GAC GCG CAG GAC ACG AAG CTT GTG AAC
 Ala Gly Leu Ala Ile Val Phe Ala Glu Asp Ala Gln Asp Thr Lys Leu Val Asn

 2582 2599 2609 2619 2629 2639
 CCC GTC CCT G GTACGTCTTC TGGATGCATG CGCTCCGCAC AGTGAATCAT CTTTTCGAAC
 Pro Val Pro Glu

 2649 2658 2667 2676 2685
 AG AG GAC TGG AAC AAG CTG TGC CCC ACC TTC GAT AAG GCG ATG AAC ATC ACG
 Asp Trp Asn Lys Leu Cys Pro Thr Phe Asp Lys Ala MET Asn Ile Thr

 2694 2704 2714 2724 2734 2744 2754
 —>
 GTT TCAGCGATGC GTGGCGCTCA TGGTCATTTT CTTGGAATCT TTGCATAGGG CTGCAGCACC
 Val

 2764 2774 2784 2794 2804 2814 2824
 CTGGATACTC TTTCCCTTAG CAGGATATTA TTTAATGACC CCTGCGTTTA GTGCTTAGTT AGCTTTACTA

 2834 2844 2854 2864 2874 2884 2894
 CTGGTTGTAA TGTACGCAGC ATCGGTAATT CGGATAATGC TATCAATGTG TATATTATGA CACGCGTCAT

 2904 2914 2924 2934 2944 2954 2964
 GCGCGATGCT TGAGTTGCAA GGTCCGTTTC CGATGCTCGA CATAAACGTT TCACTTACAT ACACATTGGG

 2974 2984 2994 3004 3014 3024 3034
 TCTAGAACTG GATCTATCCA TGTATACAAA AACTCCTCAT ACAGCTGACT GGGGCGCTCT AGAGCATGGG

 3044 3054 3064 3074 3084 3094 3104
 TCCGATTGAT CAGATGTCCG GAACACGAGC CTCCTGAGCT CGAGGACTCT GAGAAGCGGC GGTGCGTTCT

FIG.3F

10	20	30	40	50	60	70
GCGCGTTGGC CGATTCATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA						
80	90	100	110	120	130	140
ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC CGGCTCGTAT						
150	160	170	180	190	200	210
GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACACCTATG ACATGATTAC GAATTCCGAT						
220	230	240	250	260	270	280
CGGCTTGCCC TCATTCCTCC ATGTTCCCCC GACCGAGCGG GCGCGTCAAT GGCCCGTTTG CGAACACATA						
290	300	310	320	330	340	350
TGCAGGATAA ACAGTGCGAA ATATCAATGT GGCGGCGACA CAACCTCGCC GGCCGACACT CGACGCTGTT						
360	370	380	390	400	410	420
GATCATGATC ATGTCTTGTG AGCATTCTAT ACGCAGCCTT GGAAATCTCA GGCGAATTTG TCTGAATTGC						
430	440	450	460	470	480	490
GCTGGGAGGC TGGCAGCGCA GATCGGTGTG TCGGTGCAGT AGCCGAGCGA GCACCTGGCG GAAGCCGACA						
500	510	520	530	540	550	560
TCTCGGGTAC CACTTGATCT CCGCCAGATC ACTGCGGTTC CGCCATCGGC CGCGGGGCCC ATTCTGTGTG						
570	580	590	600	610	620	630
TGCCTGTAG CACTCTGCAT TCAGGCTCAA CGTATCCATG CTAGAGGACC GTCCAGCTGT TGGCGCACGA						
640	650	660	670	680	690	700
TTCCGCGAGA AAGCTGTACA GGCAGATATA AGGATGTCCG TCCGTCAGAG ACTCGTCACT CACAAGCCTC						

FIG.4A
18 / 38

710	720	730	740	750	760	770
TTTTCTCTT CGCCTTTCCA GCCTCTTCCA ACGCCTGCCA TCGTCTCTT AGTTCGCTCG TCCATTCTTT						
780	790	799	808	817	826	
CTGCGTAGTT	AATC	ATG	GGC	AGG	TTC	TCA
		MET	Gly	Arg	Phe	Ser
						Ser
						Leu
						Cys
						Ala
						Leu
						Thr
						Ala
						Val
						Ile
835	844	853	862	871	880	
CAC	TCT	TTT	GGT	CGT	GTC	TCC
His	Ser	Phe	Gly	Arg	Val	Ser
						Ala
						Ala
						Ile
						Gly
						Pro
						Val
						Thr
						Asp
						Leu
						Thr
						Ile
889	898	907	916	925	934	
TCC	AAT	GGG	GAC	GTT	TCT	CCC
Ser	Asn	Gly	Asp	Val	Ser	Pro
						Asp
						Gly
						Phe
						Thr
						Arg
						Ala
						Ala
						Val
						Leu
						Ala
						Asn
943	952	961	970	980	990	
GGC	GTC	TTC	CCG	GGT	CCT	CTT
Gly	Val	Phe	Pro	Gly	Pro	Leu
						Ile
						Thr
						Gly
						Asn
						Lys
1000	1010	1020	1029	1038	1047	
CTACACCCTA	CAAGCCTTCT	AACTCTTTTA	CCACAG	GGC	GAC	AAC
				Gly	Asp	Asn
						Phe
						Gln
						Ile
						Asn
						Val
1056	1065	1074	1083	1092	1105	
ATC	GAC	AAC	CTC	TCT	AAC	GAG
Ile	Asp	Asn	Leu	Ser	Asn	Glu
						Thr
						MET
						Leu
						Lys
						Ser
						Thr
						Ser
						Ile
1115	1125	1135	1145	1156	1165	
CTACTGCTTC	TTAGTCTTGG	CAATGGCTCA	AGGTCTCCTC	CGCAG	CAT	TGG
					His	Trp
						His
						Gly
						Phe

FIG.4B

1174	1183	1192	1201	1210	1219
TTC CAG AAG GGT ACT AAC TGG GCT GAT GGA GCT GCC TTC GTC AAC CAG TGC CCT					
Phe Gln Lys gly thr Asn Trp Ala Asp Gly Ala Ala Phe Val Asn Gln Cys Pro					
1228	1237	1246	1235	1264	
ATC GCG ACG GGG AAC TCT TTC CTT TAC GAC TTC ACC GCG ACG GAC CAA GCA G					
Ile Ala Thr Gly Asn Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Thr Ala Thr Asp Gln Ala Gly					
1281	1291	1301	1311	1321	1331
GTCAGTGCCT GTGGCGCTTA TGTTTTCCCG TAATCAGCAG CTAACACTCC GCACCCACAG GC					
1342	1351	1360	1369	1378	1387
ACC TTC TGG TAC CAC AGT CAC TTG TCT ACG CAG TAC TGC GAT GGT TTG CCG GGC					
Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly					
1396	1405	1414	1423	1432	1441
CCG ATG GTC GTA TAC GAC CCG AGT GAC CCG CAT GCG GAC CTT TAC GAC GTC GAC					
Pro MET Val Val Tyr Asp Pro Ser Asp Pro His Ala Asp Leu Tyr Asp Val Asp					
1450	1459	1468	1477	1486	1495
GAC GAG ACC ACG ATC ATC ACG CTC TCT GAT TGG TAT CAC ACC GCT GCT TCG CTC					
Asp Glu Thr Thr Ile Ile Thr Leu Ser Asp Trp Tyr His Thr Ala Ala Ser Leu					
1504	1519	1529	1539	1549	1559
GGT GCT GCC TTC CC	GTAAGTTTAC	CCCAGCGCAC	GGAGTTAAGA	CCGATCTAA	CTGTAATACC
Gly Ala Ala Phe Pro					
1568	1577	1586	1604	1614	
TTCAG G	ATT GGC TCG GAC TCT ACC CTG ATT AAC GG	GTTGGCCGCT	TCGCGGGTGG		
Ile Gly Ser Asp Ser Thr Leu Ile Asn Gly					

FIG.4C

1624	1633	1642	1651	1669													
TGACAG	C	ACT	GAC	CTT	GCG	GTT	ATC	ACT	GTC	GAG	CAG	GGC	AAG	CG	GTTAGTGATA		
	Thr	Asp	Leu	Ala	Val	Ile	Thr	Val	Glu	Gln	Gly	Lys	Arg				
1679	1689	1699	1709	1719	1728												
CCCTCTACAG	TTGACACTGT	GCCATTGCTG	ACAGTACTCT	CAG	C	TAC	CGT	ATG	CGT	CTT							
						Tyr	Arg	MET	Arg	Leu							
1737	1746	1755	1764	1773	1782												
CTC	TCG	CTG	TCT	TGC	GAC	CCC	AAC	TAT	GTC	TTC	TCC	ATT	GAC	GGC	CAC	AAC	ATG
Leu	Ser	Leu	Ser	Cys	Asp	Pro	Asn	Tyr	Val	Phe	Ser	Ile	Asp	Gly	His	Asn	MET
1791	1800	1809	1818	1827	1836												
ACC	ATC	ATC	GAG	GCC	GAC	GCC	GTC	AAC	CAC	GAG	CCC	CTC	ACG	GTT	GAC	TCC	ATC
Thr	Ile	Ile	Gln	Ala	Asp	Ala	Val	Asn	His	Glu	Pro	Leu	Thr	Val	Asp	Ser	Ile
1845	1854	1863	1879	1889	1899												
CAG	ATC	TAC	GCC	GGC	CAA	CGT	TAC	TCC	TTC	GTC	GTACGTATTC	CGAACAGCCA	TGATCAGGCC				
Gln	Ile	Tyr	Ala	Gly	Gln	Arg	Tyr	Ser	Phe	Val							
1909	1919	1928	1937	1946	1955												
AAGCCCGATG	CTAACGCGCC	TACCCTCAG	CTT	ACC	GCT	GAC	CAG	GAC	ATC	GAC	AAC	TAC					
			Leu	Thr	Ala	Asp	Gln	Asp	Ile	Asp	Asn	Tyr					
1964	1973	1982	1991	2000	2009												
TTC	ATC	CGT	GCC	CTG	CCC	AGC	GCC	GGT	ACC	ACC	TCC	TTC	GAC	GGC	GGC	ATC	AAC
Phe	Ile	Arg	Ala	Leu	Pro	Ser	Ala	Gly	Thr	Thr	Ser	Phe	Asp	Gly	Gly	Ile	Asn
2018	2027	2036	2045	2054	2063												
TCG	GCT	ATC	CTG	CGC	TAC	TCT	GGT	GCC	TCC	GAG	GTT	GAC	CCG	ACG	ACC	ACG	GAG
Ser	Ala	Ile	Leu	Arg	Tyr	Ser	Gly	Ala	Ser	Glu	Val	Asp	Pro	Thr	Thr	Thr	Glu

FIG.4D

2072	2081	2090	2099	2108	2117												
ACC	ACG	AGC	GTC	CTC	CCC	CTC	GAC	GAG	GCG	AAC	CTC	GTG	CCC	CTT	GAC	AGC	CCC
Thr	Thr	Ser	Val	Leu	Pro	Leu	Asp	Glu	Ala	Asn	Leu	Val	Pro	Leu	Asp	Ser	Pro
2126	2136	2146	2156	2166	2176												
GCT	GCT	GTACGTCGTA	TTCTGCGCTT	GCAAGGATCG	CACATACTAA	CATGCTCTTG	TAG	CCC									
Ala	Ala							Pro									
2185	2194	2203	2212	2221	2230												
GGT	GAC	CCC	AAC	ATT	GGC	GGT	GTC	GAC	TAC	GCG	CTG	AAC	TTG	GAC	TTC	AAC	TTC
Gly	Asp	Pro	Asn	Ile	Gly	Gly	Val	Asp	Tyr	Ala	Leu	Asn	Leu	Asp	Phe	Asn	Phe
2239	2248	2257	2266	2275	2284												
GAT	GGC	ACC	AAC	TTC	TTC	ATC	AAC	GAC	GTC	TCC	TTC	GTG	TCC	CCC	ACG	GTC	CCT
Asp	Gly	Thr	Asn	Phe	Phe	Ile	Asn	Asp	Val	Ser	Phe	Val	Ser	Pro	Thr	Val	Pro
2293	2302	2311	2320	2329	2338												
GTC	CTC	CTC	CAG	ATT	CTT	AGC	GGC	ACC	ACC	TCC	GCG	GCC	GAC	CTT	CTC	CCC	AGC
Val	Leu	Leu	Gln	Ile	Leu	Ser	Gly	Thr	Thr	Ser	Ala	Ala	Asp	Leu	Leu	Pro	Ser
2347	2356	2365	2374	2383	2392												
GGT	AGT	CTC	TTC	GCG	GTC	CCG	TCC	AAC	TCG	ACG	ATC	GAG	ATC	TCG	TTC	CCC	ATC
Gly	Ser	Leu	Phe	Ala	Val	Pro	Ser	Asn	Ser	Thr	Ile	Glu	Ile	Ser	Phe	Pro	Ile
2401	2410	2419	2428	2437	2446	2456											
ACC	GCG	ACG	AAC	GCT	CCC	GGC	GCG	CCG	CAT	CCC	TTC	CAC	TTG	CAC	GGT	GTACGTGTCC	
Thr	Ala	Thr	Asn	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	His	Pro	Phe	His	Leu	His	Gly		
2466	2476	2486	2496	2506	2515												
CATCTCATAT	GCTACGGAGC	TCCACGCTGA	CCGCCCTATA	G	CAC	ACC	TTC	TCT	ATC	GTT							
					His	Thr	Phe	Ser	Ile	Val							

FIG.4E

2524	2533	2542	2551	2560	2569	
CGT ACC GCC GGC AGC ACG GAT ACG AAC TTC GTC AAC CCC GTC CGC CGC GAC GTC						
Arg Thr Ala Gly Ser Thr Asp Thr Asn Phe Val Asn Pro Val Arg Arg Asp Val						
2578	2587	2596	2605	2614	2624	
GTG AAC ACC GGT ACC GTC GGC GAC AAC GTC ACC ATC CGC TTC ACC GTACGCAGCA						
Val Asn Thr Gly Thr Val Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Thr						
2634	2644	2654	2664	2673	2682	
CTCTCCTAAC ATTCCCACTG CGCGATCACT GACTCCTCGC CCACAG						
				ACT GAC AAC CCC GGC		
				Thr Asp Asn Pro Gly		
2691	2700	2709	2718	2727	2736	
CCC TGG TTC CTC CAC TGC CAC ATC GAC TTC CAC TTG GAG GCC GGT TTC GCC ATC						
Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Glu Ala Gly Phe Ala Ile						
2745	2754	2763	2772	2781	2798	
GTC TTC AGC GAG GAC ACC GCC GAC GTC TCG AAC ACG ACC ACG CCC TCG A GTACGTTGTG						
Val Phe Ser Glu Asp Thr Ala Asp Val Ser Asn Thr Thr Thr Pro Ser Thr						
2808	2818	2828	2838	2850	2859	
CTCCCGTGCC CATCTCCGCG CGCCTGACTA ACGAGCACCC CTTACAG						
				CT GCT TCG GAA GAT		
				Ala Trp Glu Asp		
2868	2877	2886	2895	2908	2918	
CTG TGC CCC ACG TAC AAC GCT CTT GAC TCA TCC GAC CTC TAATCGGTTC AAAGGGTCGC						
Leu Cys Pro Thr Tyr Asn Ala Leu Asp Ser Ser Asp Leu						
2928	2938	2948	2958	2968	2978	2988
TCGCTACCTT AGTAGGTAGA CTTATGCACC GGACATTATC TACAATGGAC TTTAATTTGG GTTAACGGCC						
2998	3008	3018	3028	2038	3048	3058
GTATACATA CGCGCACGTA GTATAAAGGT TCTCTGGATT GGTCCGACCT ACAGACTGCA ATTTTCGTGA						
3068	3078	3088	3098			
CCTATCAACT GTATATTGAA GCACGCAGT GAATGGAAAT AGAGACA						

10	20	30	40	50	60	70
CTCATAACTC TTCGCTTCTA GCATGGGGGC TGCCACACCC TGACAGACCC TTCGGGAGGC GAACTCGAAT						
80	90	100	110	120	130	140
GCAGCGTACT CTATCNCACC TCCAGGAAAG GTAGGGATGG ACNCCGTGCA CCAACAACCTG TCTCTCCACC						
150	160	170	180	190	200	210
AGCAACCATC CCTTGGATAT GTCTCCACAC ACCCGGTGTC TACAAGCGGG GATCTGTGCT GGTGAAGTGC						
220	230	240	250	260	270	280
TGCTCTCCGGA GCGGCGGCGG CGAGCGACCA GAACCCGAAC CAGTGCTAGT GCGCGACACC CGCGAGACAA						
290	300	310	320	330	340	350
<u>TTGTGCAGGG</u> TGAGTTATAT TCTTCGTGAG ACGGCGCTGC GCGTCGGCAC TGAAAGCGTC GCAGTTAGGT						
360	370	380	390	400	410	420
GATGCAGCGG TCCGCGCTAT TTTTGACGTC TGGCAGCTAT CCTAAGCCGC GCCTCCATAC ACCCCAGGCG						
430	440	450	460	470	480	490
CTCTCGTTTG CTATAGGTAT <u>AAATCCCTCA</u> GCTTCAGAGC GTCGATCCTC ATCCCACACG ACACCCGTTT						
500	510	520	530	540	550	
CAGTCTTCTC GTAGCGCATT CCCTAGCCGC CCAGCCTCCG CTTTCGTTTT CAAC				<u>></u> <u>ATG</u> <u>GGC</u> <u>AAG</u> MET Gly Lys		
559	568	577	586	595	604	
<u>TAT</u>	<u>CAC</u>	<u>TCT</u>	<u>TTT</u>	<u>GTG</u>	<u>AAC</u>	<u>GTC</u>
Tyr	His	Ser	Phe	Val	Asn	Val
<u>GTC</u>	<u>GTC</u>	<u>GCC</u>	<u>CTT</u>	<u>AGT</u>	<u>CTT</u>	<u>TCT</u>
Val	Val	Ala	Leu	Ser	Leu	Ser
<u>TTG</u>	<u>AGC</u>	<u>GGT</u>	<u>CGT</u>	<u>GTG</u>		
Leu	Ser	Gly	Arg	Val		
613	622	631	640	649	658	
<u>TTC</u>	<u>GGC</u>	<u>GCC</u>	<u>ATT</u>	<u>GGG</u>	<u>CCC</u>	<u>GTC</u>
Phe	Gly	Ala	Ile	Gly	Pro	Val
<u>ACC</u>	<u>GAC</u>	<u>TTG</u>	<u>ACT</u>	<u>ATC</u>	<u>TCT</u>	<u>AAC</u>
Thr	Asp	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn
<u>GCC</u>	<u>GAT</u>	<u>GTT</u>	<u>ACG</u>			
Ala	Asp	Val	Thr			

FIG.5A

667	676	685	694	703	712	
CCT GAC GGC ATT ACT CGT GCT GCT GTC CTC GCG GGC GGC GTT TTC CCC GGG CCC						
Pro Asp Gly Ile Thr Arg Ala Ala Val Leu Ala Gly Gly Val Phe Pro Gly Pro						
721	730	743	753	763	773	783
CTC ATT ACC GGC AAC AAG GTGAGCCCGG AAACCTTCTA CTAGCGCGCT CGTACGGTGC ACCGTTACTG						
Leu Ile Thr Gly Asn Lys						
793	803	814	823	832	841	
AAGCCACACT TTGCGCTGTC AACAG GGG GAT GAA TTC CAG ATC AAT GTC ATC GAC AAC						
		Gly Asp Glu Phe Gln Ile Asn Val Ile Asp Asn				
850	859	868	877	887	897	
CTG ACC AAC GAG ACC ATG TTG AAG TCG ACC ACA ATC GTAAGGTGCT TGCTCCCAT						
Leu Thr Asn Glu Thr MET Leu Lys Ser Thr Thr Ile						
907	917	927	938	947	956	
ATTAAGCCCG TCGCTGACTC GAAGTTTATC TGTAG CAC TGG CAT GGT ATC TTC CAG GCC						
			His Trp His Gly Ile Phe Gln Ala			
965	974	983	992	1001	1010	
GGC ACC AAC TGG GCA GAC GGC GCG GCC TTC GTG AAC CAG TGC CCT ATC GCC ACG						
Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Ala Ala Phe Val Asn Gln Cys Pro Ile Ala Thr						
1019	1028	1037	1046		1063	
GGA AAC TCG TTC TTG TAC GAC TTC ACC GTT CCT GAT CAA GCC G GTACGTTTAT						
Gly Asn Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Thr Val Pro Asp Gln Ala Gly						
1073	1083	1093	1103	1112	1121	
ACACTTCCCT TTCTGCGGCA TACTCTGACG CGCCGCTGGA TCAG GC ACC TTC TGG TAC CAC						
				Thr Phe Trp Tyr His		

FIG.5B

1130	1139	1148	1157	1166	1175
AGC CAC CTG TCC ACC CAG TAC TGT GAC GGC CTG CGC GGT CCT CTT GTG GTC TAC					
Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly Leu Arg Gly Pro Leu Val Val Tyr					
1184	1193	1202	1211	1220	1231
GAC CCC GAC GAT CCC AAC GCG TCT CTT TAC GAC GTC GAT GAC G					GTAAGCAGGC
Asp Pro Asp Asp Pro Asn Ala Ser Leu Tyr Asp Val Asp Asp Asp					
1241	1251	1261	1271	1281	1290
TACTTGTTGA CTTGTATGGA TGTATCTCAC GCTCCCCTAC AG AT ACT ACG GTT ATT ACG					
				Thr Thr Val Ile Thr	
1299	1308	1317	1326	1335	1347
CTT GCG GAC TGG TAC CAC ACT GCG GCG AAG CTG GGC CCT GCC TTC CC					GTGAGTCTAC
Leu Ala Asp Trp Tyr His Thr Ala Ala Lys Leu Gly Pro Ala Phe Pro					
1357	1367	1377	1387	1397	1408
TCTTCCTCGT GTGTTAACAT AGGTGACGGC CGCTGATACG AGAGCTACCA G C					GCG GGT CCG
					Ala Gly Pro
1417	1426	1435	1444	1453	1462
GAT AGC GTC TTG ATC AAT GGT CTT GGT CCG TTC TCC GGC GAT GGT GGA GGA GCG					
Asp Ser Val Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Phe Ser Gly Asp Gly Gly Gly Ala					
1471	1480	1489	1498	1510	1520
ACA AAC CTC ACC GTG ATC ACC GTC ACG CAA GGC AAA CG					GTGAGTCCGC CCTGAGCTGG
Thr Asn Leu Thr Val Ile Thr Val Thr Gln Gly Lys Arg					
1530	1540	1550	1561	1570	1579
CCTCAATAGC GATATTGACG AGTCCATGCC CTCCCAG					G TAC CCG TTC CGC CTT GTG TCG
					Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser

FIG.5C

1588	1597	1606	1615	1624	1633
ATC TCG TGC GAC CCC AAC TTC ACG TTC TCG ATC GAC GGG CAC AAC ATG ACC ATC					
Ile Ser Cys Asp Pro Asn Phe Thr Phe Ser Ile Asp Gly His Asn MET Thr Ile					
1642	1651	1660	1669	1678	1687
ATC GAG GTG GAC GGT GTC AAC CAC GAG GCC TTG GAC GTC GAC TCC ATT CAG ATT					
Ile Glu Val Asp Gly Val Asn His Glu Ala Leu Asp Val Asp Ser Ile Gln Ile					
1696	1705	1714	1724	1734	1744
TTT GCG GGG CAG CGG TAC TCC TTC ATC					
Phe Ala Gly Gln Arg Tyr Ser Phe Ile					
1754	1764	1774	1785	1794	1803
CCCGTCTGCT CACAGAGGCT TCTATATCGC AG					
			CTC AAC GCC AAC CAG TCC ATC GAC AAC		
			Leu Asn Ala Asn Gln Ser Ile Asp Asn		
1812	1821	1830	1839	1848	1857
TAC TGG ATC CGC GCG ATC CCC AAC ACC GGT ACC ACC GAC ACC ACG GGC GGC GTG					
Tyr Trp Ile Arg Ala Ile Pro Asn Thr Gly Thr Thr Asp Thr Thr Gly Gly Val					
1866	1875	1884	1893	1902	1911
AAC TCT GCT ATT CTT CGC TAC GAC ACC GCA GAA GAT ATC GAG CCT ACG ACC AAC					
Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Asp Thr Ala Glu Asp Ile Glu Pro Thr Thr Asn					
1920	1929	1938	1947	1956	1965
GCG ACC ACC TCC GTC ATC CCT CTC ACC GAG ACG GAT CTG GTG CCG CTC GAC AAC					
Ala Thr Thr Ser Val Ile Pro Leu Thr Glu Thr Asp Leu Val Pro Leu Asp Asn					
1974	1983	1992	2001	2010	2019
CCT GCG GCT CCC GGT GAC CCC CAG GTC GGC GGT GTT GAC CTG GCT ATG AGT CTC					
Pro Ala Ala Pro Gly Asp Pro Gln Val Gly Gly Val Asp Leu Ala MET Ser Leu					

2028	2041	2051	2061	2071	2081
<u>GAC</u> <u>TTC</u> <u>TCC</u> <u>TTC</u> <u>CTGAGTCCCA</u> <u>CAGGACTCCG</u> <u>CGCCATTTCC</u> <u>CTTATTTACG</u> <u>CAGGAGTATT</u> Asp Phe Ser Phe					
2090	2099	2108	2117	2126	2135
<u>GTTCAG</u> <u>AAC</u> <u>GGT</u> <u>TCC</u> <u>AAC</u> <u>TTC</u> <u>TTT</u> <u>ATC</u> <u>AAC</u> <u>AAC</u> <u>GAG</u> <u>ACC</u> <u>TTC</u> <u>GTC</u> <u>CCG</u> <u>CCC</u> <u>ACA</u> Asn Gly Ser Asn Phe Phe Ile Asn Asn Glu Thr Phe Val Pro Pro Thr					
2144	2153	2162	2171	2180	2189
<u>GTT</u> <u>CCC</u> <u>GTG</u> <u>CTC</u> <u>CTG</u> <u>CAG</u> <u>ATT</u> <u>TTG</u> <u>AGT</u> <u>GGT</u> <u>GGC</u> <u>CAG</u> <u>GAC</u> <u>GGC</u> <u>GGC</u> <u>AGC</u> <u>CTG</u> <u>CTC</u> Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Asp Ala Ala Ser Leu Leu					
2198	2207	2216	2225	2234	2243
<u>CCC</u> <u>AAC</u> <u>GGG</u> <u>AGT</u> <u>GTC</u> <u>TAC</u> <u>ACA</u> <u>CTC</u> <u>CCT</u> <u>TCG</u> <u>AAC</u> <u>TCG</u> <u>ACC</u> <u>ATT</u> <u>GAG</u> <u>ATC</u> <u>TCG</u> <u>TTC</u> Pro Asn Gly Ser Val Tyr Thr Leu Pro Ser Asn Ser Thr Ile Glu Ile Ser Phe					
2252	2261	2270	2279	2288	2297
<u>CCC</u> <u>ATC</u> <u>ATC</u> <u>ACC</u> <u>ACC</u> <u>GAC</u> <u>GGT</u> <u>GTT</u> <u>CTG</u> <u>AAC</u> <u>GGC</u> <u>CCC</u> <u>GGT</u> <u>GCT</u> <u>CCG</u> <u>CAC</u> <u>CCG</u> <u>TTC</u> Pro Ile Ile Thr Thr Asp Gly Val Leu Asn Ala Pro Gly Ala Pro His Pro Phe					
2306	2319	2329	2339	2349	2359
<u>CAT</u> <u>CTC</u> <u>CAC</u> <u>GGC</u> <u>GTAAGTCCTT</u> <u>GCTTTCCTCA</u> <u>GTGCCTCGCT</u> <u>TCCACGACGT</u> <u>CCACTGATCC</u> His Leu His Gly					
2369	2380	2389	2398	2407	2416
<u>CACACATCCC</u> <u>ATGTGCAG</u> <u>CAC</u> <u>ACC</u> <u>TTC</u> <u>TCG</u> <u>GTG</u> <u>GTG</u> <u>CGC</u> <u>AGC</u> <u>GCC</u> <u>GGG</u> <u>AGC</u> <u>TCG</u> <u>ACC</u> His Thr Phe Ser Val Val Arg Ser Ala Gly Ser Ser Thr					
2425	2434	2443	2452	2461	2470
<u>TTC</u> <u>AAC</u> <u>TAC</u> <u>GCC</u> <u>AAC</u> <u>CCA</u> <u>GTC</u> <u>CGC</u> <u>CGG</u> <u>GAC</u> <u>ACC</u> <u>GTC</u> <u>AGT</u> <u>ACT</u> <u>GGT</u> <u>AAC</u> <u>TCT</u> <u>GGC</u> Phe Asn Tyr Ala Asn Pro Val Arg Arg Asp Thr Val Ser Thr Gly Asn Ser Gly					

FIG.5E

2479	2488	2504	2514	2524	2534	
GAC AAC GTC ACT ATC CGC TTC ACG	GTACGTCTTC	TCCGGAGCCC	TCCCACCCGT	GTGTCCGCTG		
Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Thr						
2544	2554	2564	2574	2583	2592	
AGCGCTGAAC	ACCGCCCACC	GTGCTGCTGC	TGCGCAG	ACC GAC AAC CCA GGC CCG TGG		
				Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp		
2601	2610	2619	2628	2637	2646	
TTC CTC CAC TGC CAC ATC GAC TTC CAC CTG GAG GCC GGC TTC GCC ATC GTC TGG						
Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Glu Ala Gly Phe Ala Ile Val Trp						
2655	2664	2673	2682	2699		
GGG GAG GAC ACT GCG GAC ACC GCG TCC GCG AAT CCC GTT CCT A				GTACGTCGTG		
Gly Glu Asp Thr Ala Asp Thr Ala Ser Ala Asn Pro Val Pro Thr						
2709	2710	2729	2739	2749	2759	
CCTGCTGAGC	TCTTTGTGCC	CCAACAGGGT	GCTGATCGTC	CCTTCCTCCG	TGCAG CG GCG TGG	
					Ala Trp	
2768	2777	2786	2795	2804	2817	
AGC GAT TTG TGC CCC ACT TAC GAT GCT TTG GAC TCG TCC GAC CTC					TGATCGACAA	
Ser Asp Leu Cys Pro Thr Tyr Asp Ala Leu Asp Ser Ser Asp Leu						
2827	2837	2847	2857	2867	2877	2887
GGCATGAAGG	CTGAAGCAGC	TGCGGTCAAT	TCTCGAACAC	ACTTTACTCG	AACATTCAAT	TTTCTTTGGC
2897	2907	2917				
TCGGGATCGG	AACAAATCAT	GGGGGGGCCG	GACCGTCT			

FIG.5F

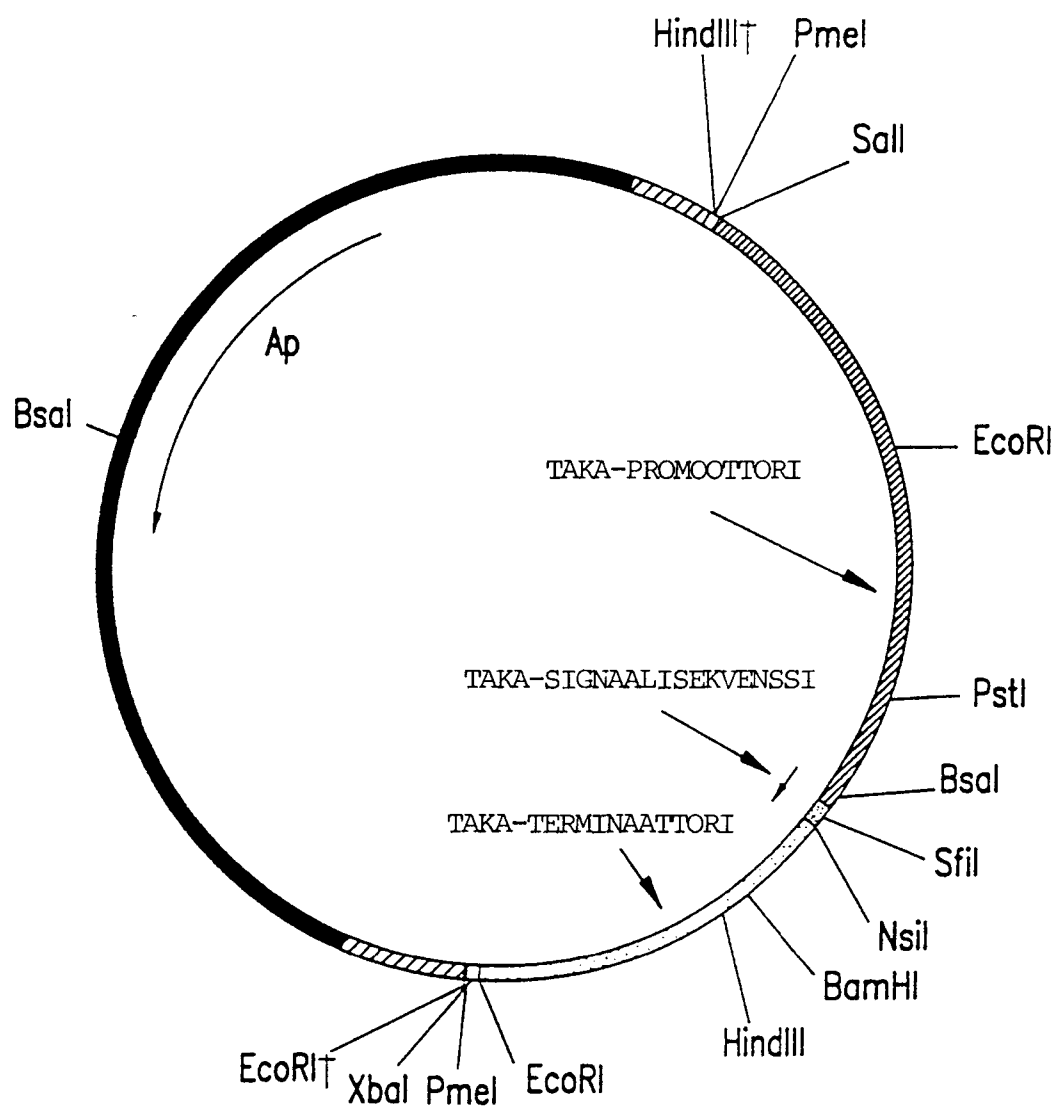


FIG.6

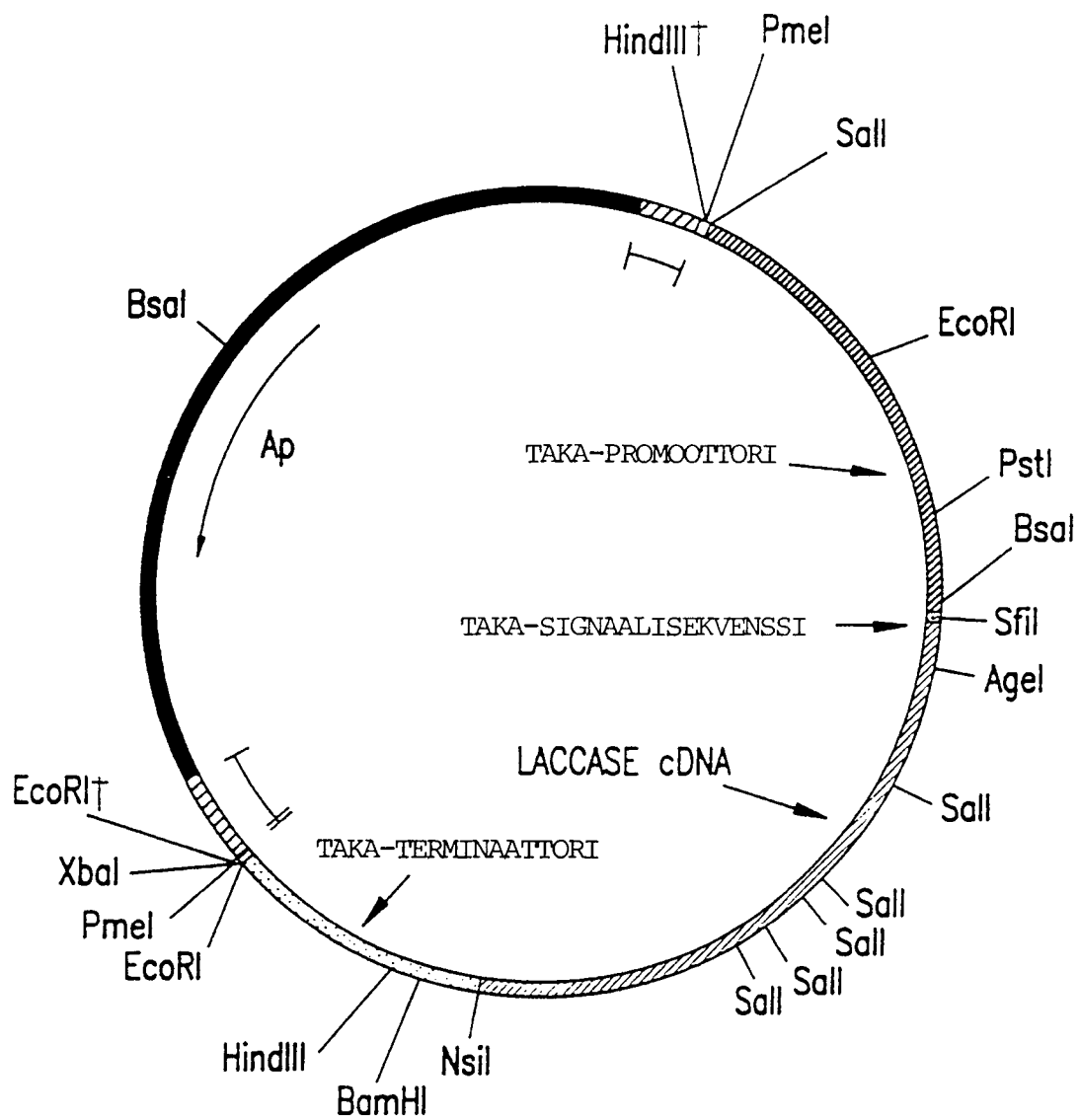


FIG.7

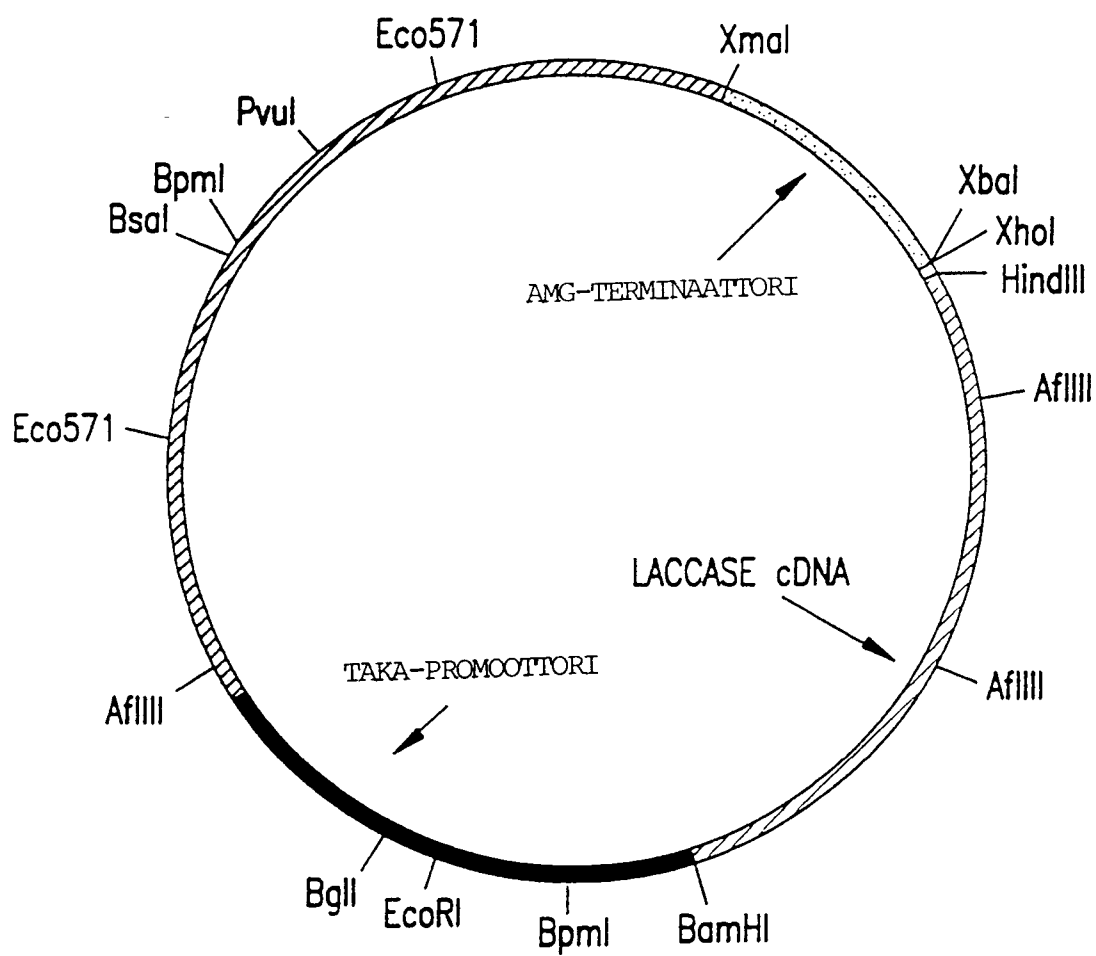


FIG.8

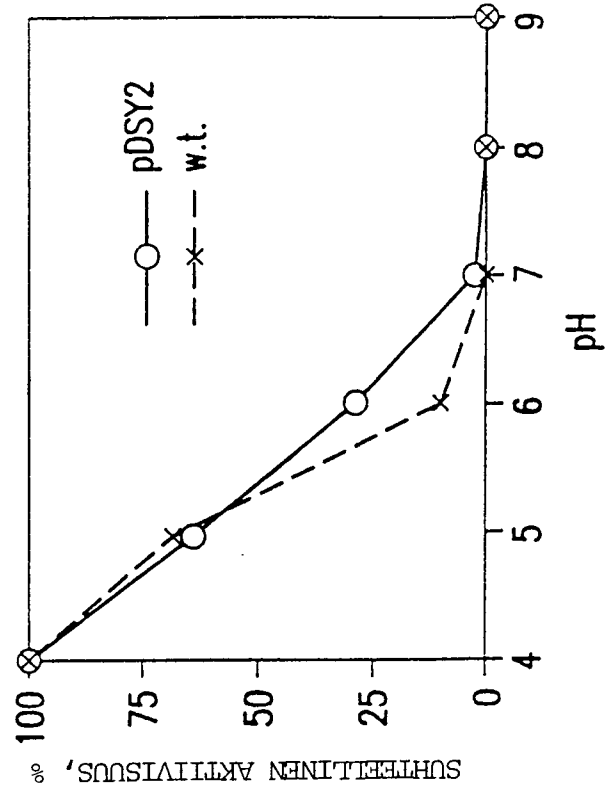


FIG. 9B

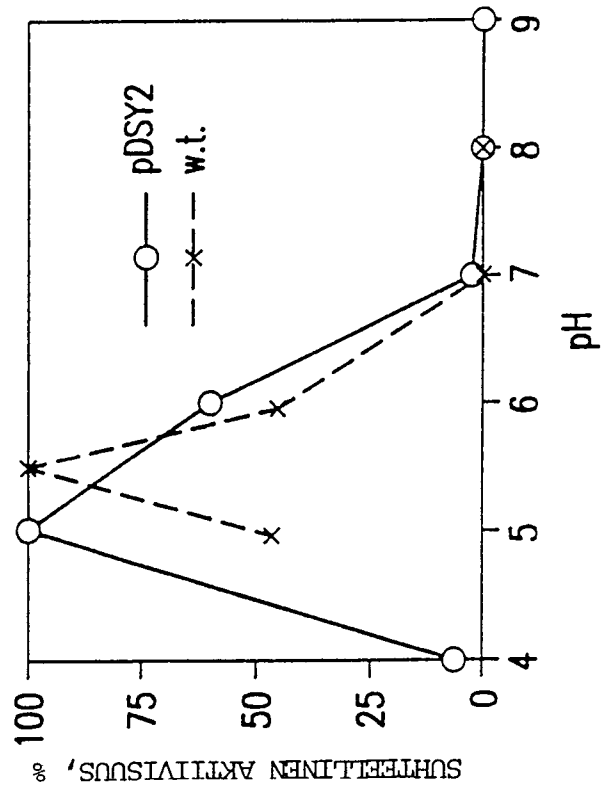


FIG. 9A

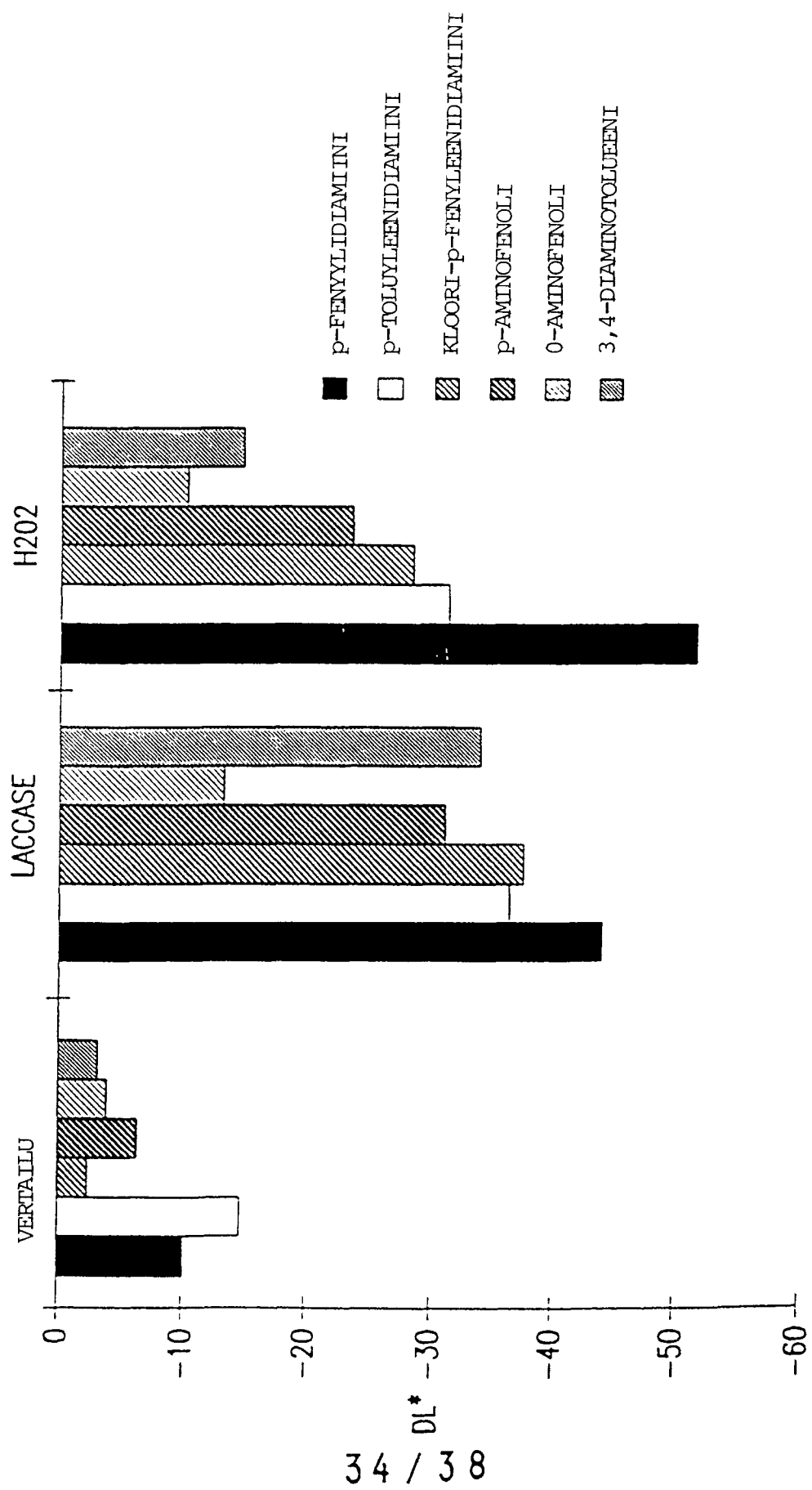


FIG.10

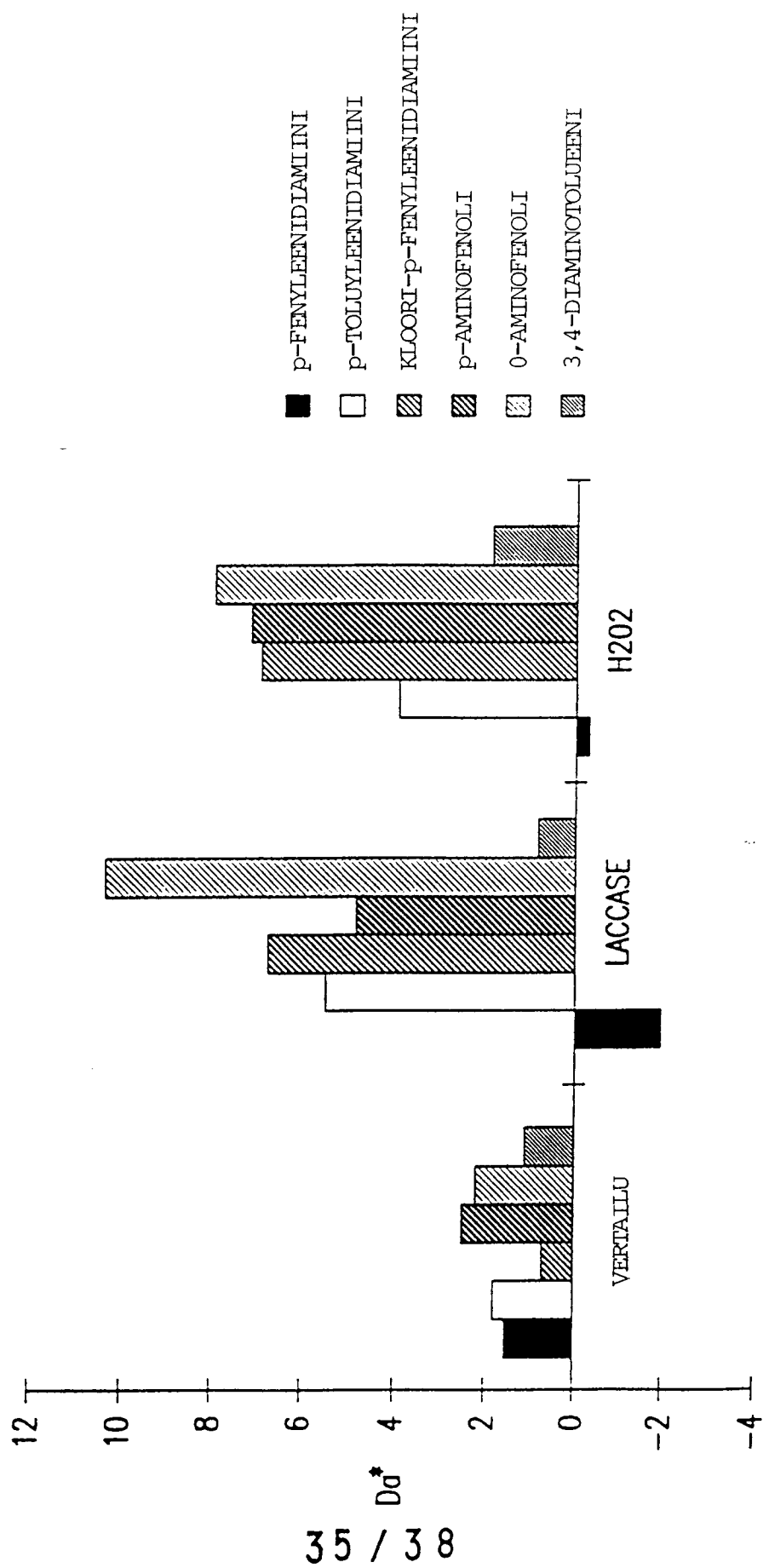


FIG.11

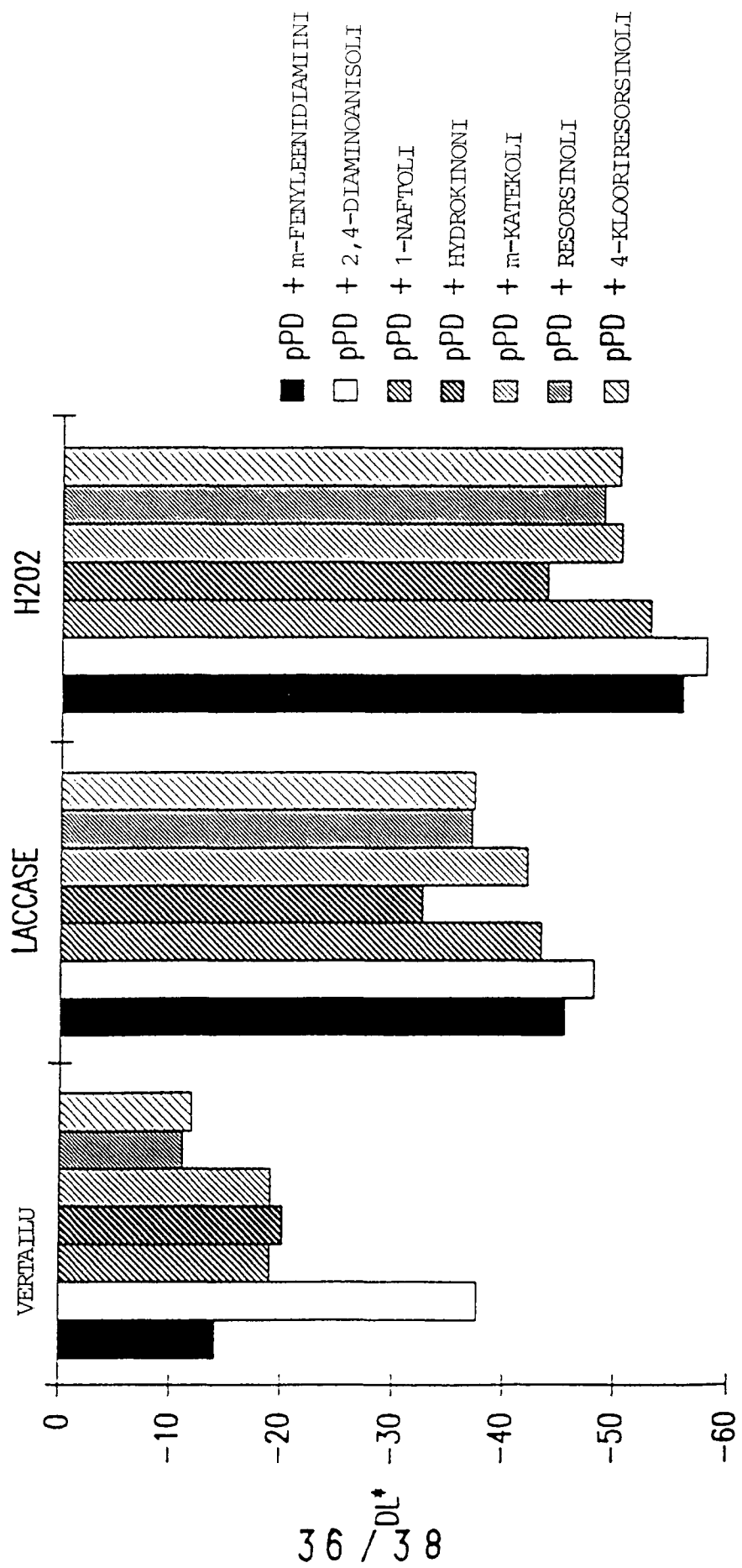


FIG.12

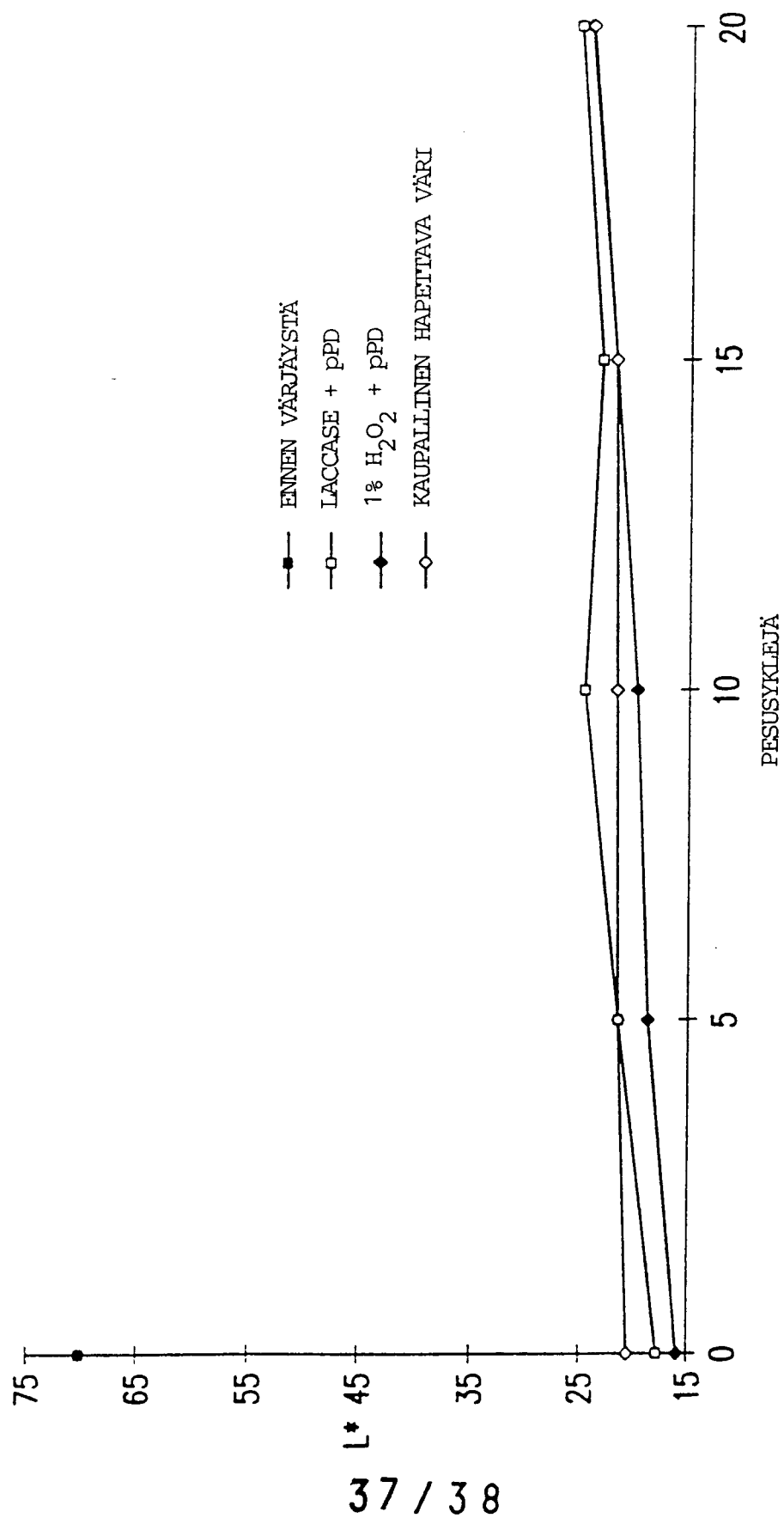


FIG.13

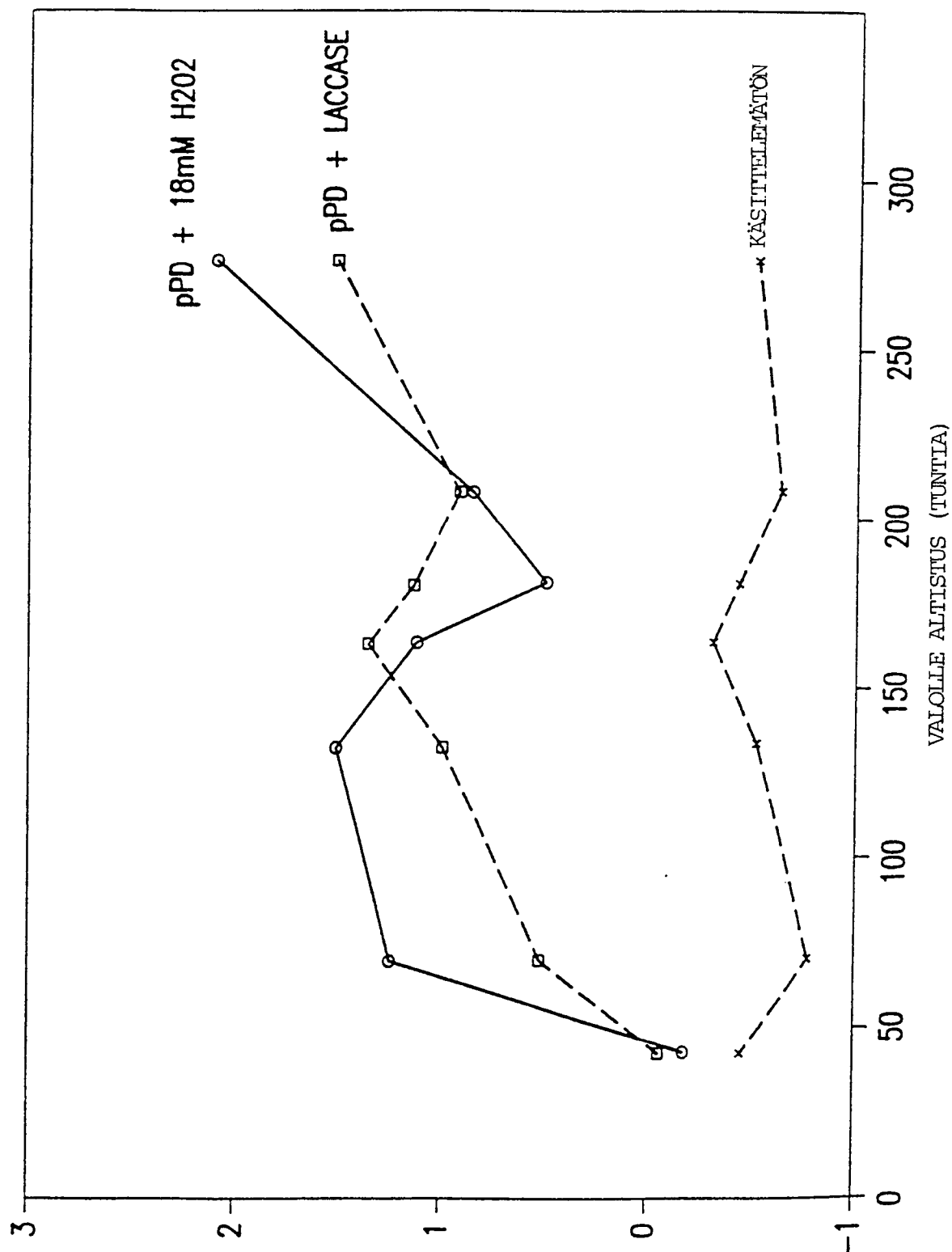


FIG.14