



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **314091**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 12 N 9/00

Patentstyret

(21) Søknadsnr	20005428	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	2000.10.27	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	2000.10.27	(30) Prioritet	2000.01.12, NO, 20000163
(41) Alm. tilgj.	2001.07.13		
(45) Meddelt dato	2003.01.27		

(71) Patenthaver	Biotec ASA, Strandgata 3, 9008 Tromsø, NO
(72) Oppfinner	Olav Lanes, 9009 Tromsø, NO Nils Peder Willasen, 9010 Tromsø, NO Per Henrik Guddal, 3750 Drangedal, NO Dag Rune Gjellesvik, 9009 Tromsø, NO
(74) Fullmektig	Zacco Norway AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Varmelabil uracil-DNA-glykosylase, DNA-sekvens som koder for enzymet, mikroorganisme som inneholder DNA-sekvensen, samt anvendelse av enzymet**

(56) Anførte publikasjoner Jaeger et al., (april 2000 a9), Ectremophiles nr. 4: 155-122
Sobek H. et al., 1996, FEBS Letters 338:1-4
Schmidt M. et al., 1996. Biochemica No. 2: 13-15
Sobek H. et al., Conference papers Biotechnol.Appl. Cold adapted Organisms. Vol 75; Issue 85
WO 9720922, WO 9725416
Mol et al., 1995.Cell 80: 869-878

(57) Sammendrag

Det beskrives et nytt enzym tilstede i torskellever, en DNA-sekvens som koder for enzymet eller operative deler derav, et nytt rekombinant DNA omfattende genet eller operative deler derav, en metode for fremstilling av enzymet fra torskellever og fra bakterier som bærer genet bakterier som bærer genet *per se*, og anvendelse av proteinet i overvåkning og/eller kontroll av PCR eller relaterte reaksjonssystemer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører et varmelabilt enzym med uracil-DNA-glykosylase (UDG) -aktivitet, DNA-sekvens som koder for enzymet, mikroorganisme som inneholder DNA-sekvensen, samt anvendelse av enzymet

Uracil i DNA kan resultere fra inkorporering av dUTP istedenfor dTTP under replikasjon eller fra deaminering av cytosin i DNA. Det siste resulterer i en mutasjon ved den neste runde av replikasjon. Enzymet uracil-DNA-glykosylase (UDG, EC 3.2.2.3) fungerer som et reparasjonsenzym for slik skade i DNA slik at uracilbasen klippes ut fra DNA-tråden (Lindahl 1994), og det skapes et apyrimidinsete som gjenkjennes av andre DNA-reparasjonsenzymer. Dette enzymet er avgjørende for å opprettholde DNA-integritet, og har derfor blitt funnet i en rekke organismer; virus, prokaryoter og eukaryoter.

Uracil-DNA-glykosylase (UNG eller UDG) katalyserer hydrolysen av N-glykosylbindingen mellom deoksyribosesukkeret og basen i uracilinneholdende DNA, og ble først isolert og karakterisert fra *Escherichia coli* (1). Dette er det første trinnet i baseutklippingsreparasjons (BER) reaksjonsveien og fjerner uracil fra DNA (2), og apyrimidinsetet som dannes, repareres deretter av en AP-endonuklease, fosfodiesterase, DNA-polymerase og DNA-ligase (andre enzymer) i BER-reaksjonsveien (3-5).

En rekke klasser av uracil-DNA-glykosylaser (UNG eller UDG) har blitt beskrevet. Den cellulære hovedformen av UNG er UNG som kodes for av UNG-genet (6). Andre klasser omfatter cyklinlignende human UDG2 (7, 8), enkeltkjedeselektiv monofunksjonell UDG SMUG1 fra human *Xenopus* (9), G/T:U-spesifikk mismatch-DNA-glykosylase (MUG) isolert fra *E. coli* (10, 11) og *Thermotoga maritima* UDG (TMUDG) (12).

UNG er et monomert protein omtrent 25-35 kD i størrelse. Det er ikke avhengig av andre kofaktorer eller divalente kationer og er høyt konservert mellom de ulike artene [13]. UNG er imidlertid påvirket av ionestyrke. UNG-enzymet er blitt vist å virke i en prosessiv "glidende mekanisme", hvor det lokaliserer sekvensielle uracilrester før dissosiasjon fra DNA [14, 15], og en distributiv "tilfeldig treff"-mekanisme [16]. UNG har tidligere blitt isolert og karakterisert fra rottelever [17-19], humane celler og vev [20-28], kalvethymus [29, 30], slimsopp [31], gjær [32], planter [33, 34], saltvannsreker [35], prokaryoter [1, 36-45] og virus [46, 47].

I menneske og rotte, har det blitt isolert både et mitokondrielt og nukleært UNG [18, 25]. I menneske (og mus) celler kodes disse to av det samme genet (UNG) [48, 49]. Ved to ulike transkripsjonsstartsteder og alternativ spleising, dannes det to former som skiller seg kun i N-terminalsignalsekvens som målretter enzymet til nukleus (UNG2) og mitokondria (UNG1), henholdsvis [49]. Nylig har flere studier blitt utført for ytterligere å studere den N-terminale signalsekvensen, og målgevingen av UNG til nukleus og mitokondria [50-52] har åpenbart at nukleær UNG2 er fosforylert [26]. Krystallstrukturene av UNG fra menneske, herpes simplexvirus og *E. coli* er blitt oppklart [53-55]. Restene i det aktive setet er konserverte, og virkningsmåten i disse enzymene synes å være den samme med en nukleotidflippmekanisme for å fjerne uracil fra DNA [56, 57].

Enzymer fra kuldetilpassede organismer slik som atlantisk torsk (*Gadus morhua*), må kompensere for reduksjonen av kjemiske reaksjonshastigheter ved lave temperaturer for å kunne opprettholde tilstrekkelig metabolsk aktivitet. Dette kan oppnås ved høyere transkripsjonelle/translasjonelle nivåer eller forbedret katalytisk effektivitet (k_{cat}/K_M). Høyere katalytiske effektiviteter kan oppnås ved en mer fleksibel struktur sammenlignet med deres mesofile motparter som tilveiebringer forsterket evne til å undergå konformasjonelle endringer under katalysen. Redusert stabilitet til pH, temperatur og denaturerende midler anses som en konsekvens av konformasjonell fleksibilitet [58].

Foreliggende oppfinnelse vedrører en varme-labil uracil-DNA-glykosylase fra en kuldetilpasset organisme, og som har anvendelse som et enzym effektivt i "carry-over-prevention" i DNA-kopieringsreaksjoner (PCR, LCR, etc.). Det isolerte enzymet i henhold til foreliggende oppfinnelse har lignende karakteristikk som tidligere beskrevne UNG'er med hensyn til molekylvekt, isoelektrisk punkt, pH og NaCl-optima. Imidlertid har enzymet i henhold til foreliggende oppfinnelse, vist seg å være mer pH-labil og varmelabil og har en høyere relativ aktivitet ved lave temperaturer sammenlignet med et rekombinant mesofilt human UNG, noe som gjør det til en bedre kandidat i "carry-over-prevention"-tester som indikert over.

UDG fra *Escherichia coli* har vært kommersielt tilgjengelig for anvendelse i "carryover prevention" når DNA-materiale skal amplifiseres.

Forskjellige teknikker kan utnyttes for å amplifisere spesifikke DNA-sekvenser på basis av et DNA-templat. Vanlige teknikker er polymerasekjede-reaksjon (PCR) system (US patentnr. 4 683 195, 4 683 202 og 4 965 188), ligase-

amplifikasjonssystemet (PCT patentpublikasjon nr. 89/09835), det selvoppsett-
holdte sekvensreplikasjonssystemet (EP nr. 329 822 og PCT patentpublikasjon nr.
90/06995), det transkripsjonsbaserte amplifikasjonssystemet (PCT patent-
publikasjon nr. 89/01050 og EP nr. 310 229) og Q β RNA-replikasesystemet (US
5 patent nr. 4 957 858). Disse teknikkene er svært sensitive på den måten at de kan
produsere påvisbare DNA-mengder fra svært få kopier av en mål-DNA-sekvens.
Tilsvarende er teknikkene svært sensitive for kontaminering av DNA fra
omgivelsene. Hovedkilden for kontaminasjon er produkter fra tidligere utførte
oppskaleringsreaksjoner som for eksempel PCR-reaksjoner (59).

10 For å overvinne dette problemet, er det blitt utviklet en metode for å skille
mellom mål-DNA og kontaminerende DNA fra tidligere reaksjoner, for eksempel
PCR-produkt-DNA (Longo *et al.*, 1990, Hartley, 1990). I det vesentlige utføres alle
amplifikasjonsreaksjoner ved bruk av dUTP for å erstatte dTTP for derved å
inkorporere uracil i DNA i stedet for tymidin. Alle videre reaksjonsblandinger
15 behandles så med UDG. Følgende varmebehandling degraderer kontaminerende
DNA ved hydrolyse av fosfodiesterbindingen ved ikke-baseseter. Varme-
behandlingen forutsetter også å inaktivere UDG-enzymet.

Imidlertid inaktiveres ikke UDG-enzymet fra *E. coli* eller psykrofil marin
bakterie, BMTU fullstendig ved varmebehandling, og inaktiveringen er ikke
20 fullstendig irreversibel (45 og 60). Ifølge sammenlignende analyser av
restaktivitet, er det konkludert med at UNG fra BMTU inaktiveres bedre enn UNG
fra *E. coli*, men at restaktiviteten fremdeles er betydelig for den anvendelse som er
tenkt. Dette påvirker oppskaleringsreaksjonen, for eksempel PCR-reaksjonen,
produktintegritet, siden produktene degraderes med rest-UDG-enzymaktivitet. For
25 å unngå dette, er det etterpå blitt tilsatt enzyminhibitor for UDG (US patent nr.
5 536 649).

Imidlertid vil det foretrekkes å unngå å benytte ytterligere inhibitor fordi dette
representerer et ekstra trinn i reaksjonsprosedyren, restkontaminasjon av
inhibitoren kan være tilstede i senere reaksjoner, og kjøpet av inhibitor
30 representerer en ekstra kostnad når PCR-reaksjoner utføres, som beskrevet over.

Derfor vil det være en fordel å benytte et UDG-enzym som sikkert
ødelegges/inaktiveres ved varmebehandlingen etter PCR-reaksjonen for derved å
unngå tilsetning av spesifikke, kjemiske inhibitorer for UDG-enzymet.

Figur 1 viser pI-bestemmelse av atlantisk torske-UNG (cUNG). Etter isoelektrisk fokusering ved bruk av Phast Gel IEF 3-9, ble gelen kuttet i stykker på 2 mm. Hvert stykke ble overført til et eppendorfrør og inkubert over natt ved 4°C. Aktiviteten ble så målt som beskrevet i materialer og metoder.

Figur 2 viser produktinhibering av cUNG med fri uracil. Ulike konsentrasjoner av uracil ble tilsatt til testblandingen, og testen utført som beskrevet i materialer og metoder.

Figur 3 viser inhibering av cUNG med *Bacillus subtilis* bakteriofag uracil-DNA-glykosylaseinhibitor (Ugi). $6,65 \times 10^{-4}$ U av cUNG ble inkubert med $1,25 \times 10^3$ U til $2,00 \times 10^2$ U av Ugi ved bruk av standard testbetingelser som beskrevet i materialer og metoder. Én enhet av Ugi inhiberer én enhet av UNG-aktivitet, hvor UNG-aktivitet er definert som frigjøring av 60 pmol av uracil pr. minutt ved 37°C.

Figur 4 viser pH og NaCl-optimum av cUNG. Aktivitet av cUNG ble målt med variable natriumkloridkonsentrasjoner i forskjellige pH-serier som beskrevet i materialer og metode. Prosent UNG-aktivitet er satt relativt til den høyeste verdi målt, pH 7,5 med 50 mM NaCl.

Figur 5 viser temperaturoptimum av cUNG. På grunn av forlenget inkubering av enzymprøven på is under eksperimentet, er aktiviteten korrigert med hensyn til stabilitet av enzymet som beskrevet i materialer og metoder.

Figur 6 viser temperaturprofil av cUNG (▲) og rhUNG (■). Enzymaktivitet ble målt som beskrevet i materialer og metoder. Prosent UNG-aktivitet er satt relativt til den høyeste verdi for cUNG (45°C) og rhUNG (50°C) henholdsvis. På grunn av forlenget inkubering av enzymprøvene på is under eksperimentet, er aktiviteten korrigert med hensyn til stabilitet av enzymene som beskrevet i materialer og metoder.

Figur 7 viser pH-stabilitet av atlantisk torske-UNG (cUNG) og rekombinant human UNG (rhUNG). I de forskjellige pH-buffere, ble 1 U av cUNG (▲) eller rhUNG (■) inkubert i 10 minutter ved 37°C. Så ble 5 µl alikvoter overført til testblandingen, og restaktivitet målt ved bruk av standard testbetingelser som beskrevet i materialer og metoder. 100% aktivitet ble målt direkte fra en prøve fortynnet ved pH 8,0 uten noe inkuberingstrinn.

Figur 8 viser temperaturstabilitet av atlantisk torske-UNG (cUNG) (▲) og rekombinant human UNG (rhUNG) (■)

Enzym (1 U) ble inkubert ved 50°C, 37°C, 25°C og 4°C, og 5 µl alikvoter ble overført til testblandingen etter ulike tidsintervaller, og standardtester ble utført som beskrevet i materialer og metoder. Halveringstider ble bestemt til 0,5 minutter (50°C), 20 minutter (37°C), 60 minutter (25°C) og 2 timer (4°C) for cUNG og 8 minutter (50°C), 30 minutter (37°C), 150 minutter (25°C) og 2,6 timer (4°C) for rhUNG.

Figur 9 viser agarosegel som viser PCR-produkter fra "carry-over-prevention"-test ved bruk av rekombinant torsk-UNG (rcUNG).

Sporbeskrivelser: spor 1 og 8: DNA-stige; spor 2: T-inneholdende templat, ikke noe UNG; spor 3: T-inneholdende templat, $1,7 \times 10^{-3}$ U rcUNG; spor 4: U-inneholdende templat, 4×10^{-4} U rcUNG; spor 5: U-inneholdende templat, $1,7 \times 10^{-3}$ U rcUNG; spor 6: U-inneholdende templat, 4×10^{-4} U *E. coli* UNG; spor 7: U-inneholdende templat, ikke noe UNG.

Det er formål ved foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe et nytt UDG-enzym som er funksjonelt i "carry-over-prevention"-teknikker for DNA-amplifikasjonsreaksjoner, for eksempel PCR, indikert over, og som fullstendig og irreversibelt inaktiveres av varmebehandlingen normalt utført i PCR-reaksjons-syklusene.

Oppfinnelsen tilveiebringer således et enzym med uracil-DNA-glykosylase (UDG) -aktivitet og som er fullstendig deaktivert når det er oppvarmet til en temperatur over 60°C, og som ikke reaktiveres.

Videre er det er formål ved foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en DNA-sekvens som koder for et slikt enzym eller en aktiv del derav, eventuelt som inneholdes i en vektor eller vektorsystem (for eksempel et virus, et plasmid, et kosmid, etc.). Et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen er en mikroorganisme som inkluderer en slik DNA-sekvens.

Det er også et formål for den foreliggende oppfinnelsen å tilveiebringe anvendelse av et enzym i henhold til patentkravene i overvåkning og/eller kontrollering av reaksjonssystemer hvor DNA-sekvenser multipliseres, for eksempel PCR eller LCR.

Spesielt foretrukket er anvendelse av enzymet ifølge foreliggende oppfinnelse i "carry-over-prevention"-prosedyrer.

Enzymer fra kuldetilpassede organismer som lever i kalde habitater slik som atlantisk torsk (*Gadus morhua*), må kompensere reduksjonen av kjemiske reaksjonshastigheter ved lave temperaturer for å opprettholde tilstrekkelige metabolske aktiviteter. Dette kan gjøres ved et høyere transkripsjons/-
5 translasjonsnivå, eller forbedret katalytisk effektivitet (k_{cat}/K_M). Denne høyere effektiviteten oppnås ved en mer fleksibel struktur sammenlignet med deres mesofile motparter som tilveiebringer forsterket evne til å undergå konformasjonelle forandringer under katalyse. Den reduserte stabilitet for pH, temperatur og denaturerende midler anses som en konsekvens av den
10 konformasjonelle fleksibilitet (58).

I lys av ulempene med kontamineringer av UDG i henhold til teknikkens stilling i "carry-over-prevention"-prosedyrer når DNA-sekvenser amplifiseres (PCR, LCR), vil det være meget passende å tilveiebringe et UDG-enzym som blir 100% deradert ved enkel varmebehandling. Det har nå blitt funnet at et UDG-enzym
15 isolert fra torsk har denne verdifulle egenskapen. Torske-UDG-enzymet isolert i henhold til den foreliggende oppfinnelsen, har en lignende molekylvekt, isolelektrisk punkt, pH- og NaCl-optimum som tidligere beskrevne UNG'er, men den foreliggende torske-UNG er mer pH- og varmelabil og har en høyere relativ aktivitet ved lave temperaturer sammenlignet med den rekombinante mesofile
20 humane UNG.

Nedenfor er det beskrevet en isoleringsprosedyre for den relevante torske-UNG-proteinet i henhold til oppfinnelsen, så vel som isolering av DNA som koder for dette proteinet og dets anvendelse i mikroorganismer for rekombinant fremstilling av det relevante UNG-enzymet i henhold til oppfinnelsen.

MATERIALER OG METODER

Q-sepharose FF, S-sepharose FF, Heparin sepharose HP (Hi-trap 5 ml), Poly-U-sepharose 4B, Superdex 75 HR10/30, Phast system og Phast IEF-geler (3-9) og LMW-gelfiltreringsskalibretestsett ble oppnådd fra Amersham
30 Pharmacia Biotech, Uppsala, Sverige). Deoksy[5-³H]uridin 5'-trifosfat (19,3 Ci/mmol) ble forhandlet fra Amersham (U.K.). Uracil-DNA-glykosylaseinhibitor (Ugi) ble oppnådd fra New England Biolabs (Beverly, MA), enzymer ble forhandlet fra Promega (Madison, WI). Proteaseinhibitorer, kalvethymus-DNA (D-1501), uracil, deoksyuridin og deoksyuridin-monofosfat ble forhandlet fra Sigma (St. Lois,

MO). Alle andre reagenser og buffere ble forhandlet fra Sigma og Merck (Damstadt, Tyskland).

Rensing av cUNG

5 Fremstilling av råekstrakt og alle rensetrinn ble utført ved 4°C.

Fremstilling av råekstrakt

Til 600 ml ekstraktbuffer (25 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol, pH 8,0 (25°C)) 200 g av frisk torskelever ble tilsatt og
10 homogenisert i en Atomix homogenizer (MSE, England). Før homogenisering, ble den følgende proteaseinhibitorblandingen tilsatt til ekstraktbufferen: 1 mM PMSF
1 µM pepstatin, 1 µM leupeptin, 10 µM TPCK og 10 µM TLCK (slutt-konsentrasjoner). Homogenatet ble sentrifugert ved 28.000 g i 15 minutter, og
supernatanten ble filtrert gjennom glassull. Endelig ble glycerol tilsatt til 30%
15 (volum/volum), og torskelever-råekstraktet ble frosset ved -70°C.

Q-sepharose Fast Flow

1 liter råekstrakt ble fortynnet med 1 liter buffer A (25 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% glycerol, pH 8,0) (fraksjon 1). Prøven ble applisert i to
20 porsjoner (1 liter hver) på en Q-sepharose FF-kolonne (5,0/15), ekvilibret med buffer A og så vasket med 250 ml buffer A, ved bruk av en strømningshastighet på 10 ml/minutt. Proteiner bundet til kolonnen ble eluert med 200 ml buffer A + 1,0 M NaCl, og kolonnen ble reekvilibret med buffer A før neste del av prøven ble påsatt som nevnt over. UNG-inneholdende gjennomstrømnings- og vaskefraksjoner fra
25 begge kjøringene ble samlet (fraksjon 2, 2340 ml).

S-sepharose Fast Flow

Fraksjon 2 ble applisert på en S-sepharose FF-kolonne (1,6/10) ekvilibret i buffer A, gjennomstrømningshastighet 10 ml/min. Kolonnen ble vasket med 300
30 ml buffer A + 60 mM NaCl, og eluert ved bruk av en 200 ml lineær gradient på 0,06-0,4 M NaCl i buffer A, strømningshastighet 5 ml/minutt. UNG-inneholdende fraksjoner ble oppsamlet (55 ml) og dialysert over natten i buffer A (fraksjon 3).

Heparin-sepharose (HP)

Fraksjon 3 ble applisert på en heparin-sepharose HP Hi-Trap-kolonne (1,6/2,5) ekvilibret i buffer A. Kolonnen ble vasket med 50 ml buffer A + 60 mM NaCl, og ble eluert i 50 ml lineær gradient på 0,06-0,4 M NaCl i buffer A, strømningshastighet 1 ml/minutt. UNG-inneholdende fraksjoner ble oppsamlet (fraksjon 4, 20 ml).

Poly-U-sepharose (4B)

Fraksjon 4 ble så fortynnet 5 ganger i buffer A, og tilsatt på en poly-U-sepharosekolonne (1,6/10) ekvilibret i buffer A. Kolonnen ble vasket med 60 ml buffer A + 60 mM NaCl, og ble eluert i 200 ml lineær gradient på 0,06-0,4 M NaCl i buffer A, strømningshastighet 1 ml/minutt. UNG-inneholdende fraksjoner ble oppsamlet (fraksjon 5, 70 ml).

Superdex 75

Fraksjon 5 ble konsentrert til 200 µl ved bruk av Ultrafree15 og Ultrafree-MC ultrasentrifugeringsfiltere (Millipore), molekylvektspærre 5K, og applisert på en gelfiltreringskolonne (HR 1,0/30) ekvilibret i buffer A, med en strømningshastighet på 0,5 ml/minutt. Fraksjoner (350 µl) ble samlet, og dem inneholdende UNG-aktivitet ble oppsamlet (fraksjon 6, 3 ml).

Fremstilling av substrat ved nick-translasjon

³H-dUMP DNA ble fremstilt ved nick-translasjon og polymerasekjedereaksjon (PCR). Det nick-translaterte substratet ble laget i et totalvolum på 1 ml og inneholdt 50 mM Tris/HCl, pH 7,2, 10 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 250 µg kalvethymus-DNA (renset ved fenol/kloroformekstraksjon og etanolpresipitert før anvendelse), 0,1 mM dATP, dCTP, dGTP og dUTP, hvor 3 µM av dUTP var [³H]-dUTP (19,3 Ci/mmol). Så ble 0,1 ng (5,35 x 10⁻⁴ U) Dnase I (bovin pankreas, Promega) tilsatt og 30 sekunder senere 25 U av *E. coli* DNA-polymerase. Nick-translasjonsblandingen ble inkubert ved 21°C i 24 timer. Det nick-translaterte DNA ble renset ved fenol/kloroformekstraksjon og etanolpresipitering. DNA ble resuspendert i 50 µl TE-buffer og renset med en NAP-5 kolonne (AP Biotech) ekvilibret i TE-buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) for å fjerne ikke-

inkorporerte nukleotider. Spesifikk aktivitet av nick-substratet var $1,8 \times 10^5$ dpm/ μ g (425 cpm/pmol).

Fremstilling av substrat ved PCR

5 PCR-produsert substrat ble anvendt i alle karakteriseringseksperimentene og besto av et 761 bp-fragment dannet fra kationisk trypsinogen (sstrpIV) fra atlantisk laks (*Salmo salar*) [61]. PCR ble utført i et volum på 50 μ l i en Perkin Elmer Cetus termosyklus. PCR-blandingen inneholdt 10 mM Tris/HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 0,37 mM dATP, dCTP, dGTP og dUTP, hvor 10,4 μ M av
10 dUTP var [³H]-dUTP (17,0 Ci/mmol, Amersham), 700 pg templat-DNA (sstrpIV i en pgem7zt-vektor), 2,5 μ M av oppstrøms- og nedstrømsprimere og 2 U Taq-polymerase (Roche, Sveits). PCR-reaksjonen ble utført med 30 sykluser av 94°C i 1 minutt, 45°C i 1 minutt og 72°C i 1 minutt. Så ble ytterligere 2 U av Taq-polymerase tilsatt, og PCR-reaksjonen fortsatt med 30 nye sykluser som
15 beskrevet. PCR-substratet ble rensset med QIAquick PCR-rensetestsett (Qiagen) som beskrevet av forhandler og eluert i 50x fortynnet TE-buffer, pH 8,0. Spesifikk aktivitet av PCR-substratet var $5,9 \times 10^5$ dpm/ μ g (451 cpm/pmol). Alle karakteriseringseksperimentene ble utført ved bruk av PCR-substratet.

Påvisning av uracil-DNA-glykosylaseaktivitet (standardtest)

20 Uracil-DNA-glykosylaseaktivitet ble målt i et sluttvolum på 20 μ l, inneholdende 70 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 μ g/ml BSA og 230 ng nick-substrat eller 71 ng PCR-substrat. Reaksjonsblandingen ble inkubert 10 minutter ved 37°C, og terminert ved tilsetning av 20 μ l av iskald enkeltkjedet
25 kalvethymus-DNA (1 mg/ml) og 500 μ l 10% (vekt/volum) TCA. Prøvene ble inkubert på is i 15 minutter og sentrifugert ved 16.000 g i 10 minutter. Supernatantene med syreløselig ³H-uracil ble analysert ved bruk av væske-scintillasjonsteller.

30 Én enhet av aktivitet defineres som mengden av enzym som er nødvendig for å frigjøre 1 nmol av syreløselig uracil pr. minutt ved 37°C.

Analyse av testprodukter med tynnsjikt-kromatografi

Reaksjonsprodukter etter testene ble blandet med 20 nmol uracil, deoksyuridin og deoksyuridin-monofosfat. Tynnsjikt-kromatografi ble utført i henhold til metoden til Wang og Wang, ved bruk av polyamidlagplater (BDH), og tetraklorometan, eddiksyre og aceton (4:1:4, ved volum) som løsningsmiddel [62].
Flekke påvist under UV-lys, ble kuttet ut av platen og radioaktivitet målt i en væskescintillasjonsteller.

Molekylvektbestemmelse

Molekylvekt ble bestemt ved gelfiltrering og ble utført med en Superdex 75 kolonne (1,0/30) ekvibrert i en buffer inneholdende 25 mM Tris/HCl, 1,0 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% glycerol, pH 8,0. Strømningshastigheten var 0,5 ml/minutt, og aktiviteten ble målt i fraksjoner oppsamlet (250 μ l). Bovint serumalbumin (BSA, 67 kD), ovalbumin (43 kD), kymotrypsinogenA (25 kD) og ribonukleaseA (13,7 kD) ble anvendt som standarder. Blå dextran og natriumklorid ble anvendt for å bestemme void- (V_0) og indre volum (V_i), henholdsvis.

Proteinbestemmelse

Proteinkonsentrasjoner ble bestemt med Coomassie® proteintestsett-reagens G-250 (Pierce, New York, NY) ved metoden til Bradford [63], med mikrotiterplateprotokollen som beskrevet av forhandler, ved bruk av bovin serumalbumin (BSA) som en standard.

Isoelektrisk punktbestemmelse

Isoelektrisk punktbestemmelse ble utført med Phast-systemet, isoelektrisk fokuseringsgel 3-9 og sølvfarging i henhold til metodene beskrevet av forhandler. Standarder benyttet var phycocyanin (4,45, 4,65, 4,75), β -laktoglobulin B (5,10), bovin karbonisk anhydrase (6,00), human karbonisk anhydrase (6,50), ekvin myoglobin (7,00), human hemoglobin A (7,10), human hemoglobin C (7,50), lentil lektin (7,8, 8,0, 8,2), cytochrom c (9,6), (IEF standarder pI-område 4,45-9,6, BIO-RAD). Etter fokusering, ble gelen kuttet i 2 mm stykker og hvert stykke inkubert i 250 μ l ekstraksjonsbuffer (50 mM Tris/HCl, 0,2 M NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA,

1% (volum/volum) glycerol, pH 8,0 over natt. Alikvoter av 5 µl ble overført til testblandingene og aktiviteten målt ved bruk av standard testbetingelser.

Bestemmelse av pH/NaCl-optimum

Testene ble utført i et volum på 20 µl som beskrevet i standardtesten som benytter PCR-dannet substrat og NaCl-konsentrering fra 0-200 mM med 25 mM intervaller og pH i området fra 9,5-6,5 med 0,5 pH enhetsintervaller. Alle buffere ble supplementert med 100 µg/ml BSA og 1 mM EDTA. Bufferne som ble anvendt var dietanolamin /HCl (9,5-8,5), Tris/HCl (8,5-7,5) og MOPS/NaOH (7,5-6,5). Alle bufferne ble pH-justert ved 37°C og anvendt i 25 mM konsentrasjon i testen.

Bestemmelse av temperaturoptimum

Testene ble utført i et volum på 20 µl som beskrevet i standardtesten som benytter PCR-dannet substrat. Testblandingene var som beskrevet i standardtestbetingelsene og ble justert til pH 8,0 for alle temperaturer. Temperaturområdet benyttet, var 5°C til 60°C. Aktiviteten ble målt på en sekvensiell måte med 15 minutters intervall mellom hver temperatur. Enzymene som ble anvendt, ble fortynnet i standardfortynningsbuffer (5 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 1% (volum/-volum) glycerol, pH 8,0) og plassert på is. På grunn av ustabilitet av enzymprøven på is over en forlenget periode, ble resultater korrigert med hensyn til stabilitet av enzymene inkubert i fortynningsbuffer på is med formelen $N_{(t)} = \text{cpm}/e^{-0.693(t/\lambda)}$, hvor halveringstiden (λ) av cUNG og rhUNG er henholdsvis 2 timer og 2,6 timer.

Effekt av pH og temperatur på stabilitet

pH: UNG (0,01 U) ble preinkubert (i et totalvolum på 75 µl) i 10 minutter ved 37°C i buffere inneholdende 10 mM buffer, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% glycerol, med pH i området fra 9,5-6,5 med 0,5 pH-enhet-intervaller ved bruk av dietanolamin/HCl (9,5-8,5), Tris/HCl (8,5-7,5), MOPS/NaOH (7,5-6,5) og MES/NaOH (6,5-5,5) som bufferkomponenter. Prøver på 5 µl ble overført til testblandingene, og restaktivitet ble målt ved bruk av standardtestbetingelser.

Temperatur: UNG (0,01 U) ble preinkubert (i et totalvolum på 75 µl) i 10 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% glycerol, pH 8,0 (justert ved hver

temperatur). Etter ulike tidsintervaller, som indikert i figurtekstene, ble 5µl alikvoter overført til testblandingene, og restaktivitet ble målt ved bruk av standardtestbetingelser.

5 Substratspesifisitet mot ss/ds DNA

PCR- og nick-translatert substrat ble inkubert 3 minutter ved 100°C og deretter raskt avkjølt på is for å danne ssDNA. Etter denaturering ble ssDNA-substratene anvendt i standardtestbetingelser med $6,65 \times 10^{-4}$ U rensset cUNG. Enzymaktivitet ble også målt ved bruk av dsDNA-substratene for både nick- og
10 PCR-substratene, og anvendt som referanse.

Ugi-inhibitor- og uracilproduktinhibering

Aktivitetmålingene ved bruk av PCR-substrat ble utført med $6,65 \times 10^{-4}$ U av rensset cUNG. Forskjellige konsentrasjoner av uracil (0, 1, 2 og 5 mM) eller Ugi-inhibitor (1,25 x 10³ U til 2,00 x 10² U) ble tilsatt til testblandingene (på is).
15 Aktivitet ble så målt som beskrevet under standardtestbetingelser.

RESULTATER

20 Rensing av cUNG

Atlantisk torske-UNG ble rensset 17.000 ganger med en gjenvinning på 2% som vist i tabell 1. Til tross for den høye rensefaktoren, var enzymet bare delvis rensset som bestemt på SDS-PAGE. Også utbyttet var lavt på grunn av mange rensetrinn og konsentreringen av fortynnet proteinprøve før gelfiltreringstrinnet.
25

Molekylvekt og pI-bestemmelse

Molekylvekt ble bestemt ved gelfiltrering til å være 25 kD $\pm$ 2, fra tre separate eksperimenter. Den isoelektriske punktbestemmelsen ble utført med en IEF Phast Gel med IEF-standarder i området fra 4,42-9,6. Etter IEF, ble cUNG-aktivitet eluert fra gelfragmentene og aktivitet målt som beskrevet i materialer og metoder. cUNG-aktivitet koeluerte med cytokrom c, standard med et isoelektrisk punkt på 9,6, som vist i figur 1. Cytokrom c og cUNG-aktivitet ble funnet der hvor elektroden kontakter gelen, derfor kan vi kun konkludere at pI er større enn 9,0 som er den høyeste målbare verdi ved bruk av dette systemet.
30

Substratspesifisitet

cUNG-aktivitet ble målt ved bruk av både ssDNA og dsDNA. Det ble funnet en henholdsvis 1,8 og 1,9 ganger høyere aktivitet for ssDNA enn dsDNA ved bruk av nick- og PCR-substrater som vist i tabell 2. Testprodukter ble analysert med tynnsjikt-kromatografi, og hoveddelen av radioaktiviteten ble identifisert som uracil. Imidlertid var også noe radioaktivitet kolokalisert med deoksyuridinmarkøren, men dette kunne skyldes en partiell overlapping av de to markørene. I tillegg viste det rensede cUNG ikke noen vesentlig hydrolyse av ³H-adeninmerket DNA, derfor var nukleaser ekskludert som ansvarlige for hydrolysing av DNA.

Inhibisjonsstudier

Produktinhibering med fri uracil ble undersøkt og ga mer enn 50% inhibering med 1 mM uracil i testblandingen som vist i figur 2. Ved tilsetning av 5 mM fri uracil til testblandingen, ble det observert en 78% inhibering av aktivitet. Effekten av Ugi på cUNG ble målt ved tilsetning av Ugi til testblandingen. cUNG ble klart inhibert av Ugi, som vist i figur 3.

pH- og NaCl-optimum

pH- og natriumkloridoptimum ble undersøkt ved måling av enzymaktivitet ved ulike pH'er ved bruk av NaCl-konsentrasjoner fra 0-200 mM, som vist i figur 4. Enzymet viste et bredt pH-optimum med maksimal aktivitet mellom pH 7,0-9,0 og 25-50 mM NaCl. Et skifte i NaCl-optimum ble observert hvor den optimale NaCl-konsentrasjonen skiftet fra lave konsentrasjoner ved høy pH til høyere konsentrasjoner ved lav pH. Ved liten pH 9,5, ble cUNG inhibert ved NaCl.

Temperaturoptimum

Temperaturoptimum av cUNG ble bestemt til 41°C (figur 5). For å sammenligne aktiviteten av cUNG med den mesofile rhUNG ved lave temperaturer, ble enzymaktiviteten målt fra 5-60°C, og aktiviteten ved lave temperaturer sammenlignet med deres respektive optimumtemperatur (figur 6). Aktivitetsprofilen av disse to enzymer viste liten forskjell ved 5-15°C. Imidlertid ble

det observert en høyere relativ aktivitet med cUNG enn rhUNG ved temperaturer fra 20-40°C, mens det motsatte ble observert ved høyere temperaturer (50-60°C).

Stabilitet

5 Stabiliteten av de to UNG-enzymene ble sammenlignet ved preinkubering av enzymene ved ulike pH'er. Atlantisk torsk-UNG ble vist å være mest stabil mellom pH 7,0-8,5. Ved pH 5,5 og pH 10,0, hadde den mindre enn 1% rest-aktivitet. rhUNG var mest stabil mellom pH 7,0-9,5. 3% restaktivitet var tilbake ved pH 5,5, mens det ved pH 10,0 var så mye som 66% av aktivitet tilbake, som
10 vist i figur 7. Temperaturstabiliteten til de to UNG-enzymene ble sammenlignet ved 4°C, 25°C, 37°C og 50°C. Ved 50°C ble halveringstiden bestemt til å være 0,5 minutter og 8 minutter for henholdsvis cUNG og rhUNG. Ved alle temperaturer som ble undersøkt, var rhUNG mer stabilt enn cUNG. Halveringstidene bestemt, var 20 minutter (37°C), 60 minutter (25°C) og 2 timer (4°C) for
15 cUNG og 30 minutter (37°C), 150 minutter (25°C) og 2,6 timer (4°C) for rhUNG, det største forskjellen i halveringstid ble funnet ved den høyeste temperaturen, som vist i figur 8.

Rensing og molekylvekt

20 Uracil-DNA-glykosylasen fra atlantisk torskelerver (*Gadus morhua*) ble renset 17.679 ganger ved bruk av ulike kromatografiteknikker. Enda var enzymet kun delvis renset, og flere andre bånd kunne ses på en SDS-PAGE-gel. Human nukleær og mitokondriell uracil-DNA-glykosylaser ble vist å være dannet ved alternativ spleising og ha henholdsvis en ORF på 313 og 304 aminosyrer [49].
25 Molekylvekten til cUNG ble bestemt til 25 kD. Dette er omtrent den samme molekylvekten som bestemt for UNG fra human placenta (29 kD) og rhUNG (UNG Δ 84) (27 kD), som manglet henholdsvis 77 og 84 av de første N-terminale aminosyrer, som forutsagt fra mitokondriell ORF [21, 64]. Dette foreslår at den N-terminale signalsekvensen i det rensede cUNG er prosessert eller kunstig spaltet
30 under rensingen eller at atlantisk torsk-UNG ikke har en N-terminal signal-sekvens. Under rensingen kunne vi ikke se noe tegn til ulike UNG'er som tidligere beskrevet under rensing av UNG fra rotte eller humane kilder [18, 23]. Men som en vertebrat, kunne man forvente atlantisk torsk innehar både en nukleær og en

mitokondriell form av UNG, men hittil har ingen bestrebelser vært gjort for å fastslå dette forhold.

Uracil-DNA-glykosylasen fra atlantisk torsk var lik andre uracil-DNA-glykosylaser tidligere rensset og karakterisert med hensyn til høy pl [19] og den to ganger preferansen til ssDNA sammenlignet med dsDNA [19].

Inhibering med Ugi og uracil

Bacillus subtilis-bakteriofagen PBS2 UDG-inhibitor (Ugi) inhiberer UNG ved å danne et stabilt kompleks med UNG ved fysiologiske betingelser [65, 66]. Ugi binder til human UNG ved innskudd av en beta-streng inn i det konserverte DNA-bindende sporet [67], og virker ved å etterligne DNA [68]. Dette indikerer at strukturen av substratets bindingssete av cUNG ligner andre UNG'er som inhiberes av Ugi-inhibitoren. Inhibering med fri uracil var i overensstemmelse med verdier tidligere rapportert [19].

Optimale betingelser

cUNG ble vist å ha et bredt pH-optimum fra 7,0-9,0, og aktiviteten var sterkt affisert av NaCl-konsentrasjonen. En bred optimumsaktivitet er tidligere rapportert for en rekke andre UNG'er som er karakterisert [23, 31, 40, 47]. Det er interessant at NaCl-optimumet for cUNG øker når pH avtar. Det har tidligere vært demonstrert at UNG fungerer på en prosessiv måte ved lave ionestyrker, som når NaCl-konsentrasjonen øker, skifter enzymet til en distributiv mekanisme [14] [15]. Imidlertid rapporterte Purmal et al. det motsatte, at UNG virket ved en distributiv mekanisme ved lav ionestyrke. Den prosessive mekanismen er et vanlig trekk blant mange DNA-interaktive proteiner (polymeraser, repressorer, restriksjons/modifikasjonsenzymmer, DNA-reparasjonsenzymmer), og interaksjonene er generelt elektrostatiske av natur [69-71]. I en UV-endonuklease fra *Micrococcus luteus*, har den prosessive mekanismen også vist seg å være pH-avhengig [72]. Derfor foreslår vi at skiftet i NaCl-optimum med økende pH, reflekterer den prosessive/-distributive naturen til cUNG. Det kan også være at det motstridende i de tidligere rapportene har vært forårsaket av ulike bufferkomponenter og pH i tillegg til forskjellene som allerede er beskrevet.

Temperaturoptimum (41°C) ble funnet å være lavere enn den mesofile rhUNG (45°C) [64]. Den relative aktivitet ved temperaturer fra 5-45°C var høyere

for cUNG enn for rhUNG. Ved temperaturer høyere enn 45°C, viste rhUNG en høyere relativ aktivitet enn cUNG, antagelig som en konsekvens av den lavere temperaturstabiliteten til cUNG.

5 Temperatur og pH-stabilitet

Enzymer karakterisert fra kuldetilpassede arter har blitt funnet å være mer temperatur og pH-labile, foreslått forårsaket av deres fleksible struktur for å opprettholde enzymatisk aktivitet ved lave temperaturer [73]. cUNG ble funnet å være både mer pH- og temperatur-labile enn rhUNG som er kjente trekk fra andre kuldetilpassede enzymer [73, 74].

En psykrofil UNG fra en marin bakterie, BMTU har tidligere blitt isolert og ble sammenlignet med *E. coli*-UNG med hensyn til temperaturstabilitet [45]. Den prokaryote UNG hadde en halveringstid på 2 minutter ved 40°C og 0,5 minutter ved 45°C, sammenlignet med 27 og 8 minutter for *E. coli*-UNG. cUNG ble sammenlignet med rhUNG med hensyn til både temperatur- og pH-stabilitet. Ved 50°C hadde rhUNG en halveringstid på 8 minutter, sammenlignet med 0,5 minutter for cUNG. Ved lavere temperatur, var forskjellen i halveringstid mindre, selv om rhUNG var mer stabil enn cUNG ved alle temperaturer som ble undersøkt. Begge enzymene ble vist å være labile ved lav pH, mens ved høyere pH var rhUNG mer stabil enn cUNG.

Som konklusjon, ble uracil-DNA-glykosylasen fra atlantisk torsk vist å være lik andre uracil-DNA-glykosylaser tidligere renset og karakterisert med hensyn til molekylvekt, høy pI, et bredt pH-optimum og en to gangers preferanse for ssDNA enn dsDNA. Imidlertid var cUNG vist å være mer temperatur- og pH-labil og ha en høyere relativ aktivitet ved lave temperaturer enn den mesofile rhUNG. Tatt i betraktning at UNG er et konserverte enzym blant ulike arter, kan cUNG være et egnet enzym for videre studier av kuldetilpasning på molekylnivået.

Isolering av uracil-DNA-glykosylasegenet fra *Gadus morhua*

Materialer

SuperScript™ II Rnase H⁻ Reverse Transcriptase (Gibco BRL),
Packagene® Lambda DNA-pakkesystem ble forhandlet fra Promega (Madison,

WI), deoksy[5-³H]uridin, 5'trifosfat (17,0 Ci/mmol) ble forhandlet fra Amersham (England), ekspresjonsvektor pTrc99A ble forhandlet fra Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sverige), restriksjonsenzymmer ble forhandlet fra New England Biolabs (Beverly, MA), SMARTTM PCR cDNA-bibliotekkonstruksjonssett og
 5 MarathonTM cDNA-amplifikasjonssett ble forhandlet fra Clontech (Palo Alto, CA). *Escherichia coli* NR8052 [Δ (pro-lac), thi-, ara, trpE9777, ung1] (75,76] og rensset rekombinant human UNG (UNG Δ 84) [64] ble tilveiebragt av Dr. Hans E. Krokan, Institutt for kreftforskning og molekylærbiologi, Norsk Universitet for Vitenskap og Teknologi.

Metoder

Isolering av mRNA

mRNA ble isolert fra 250 mg torskelever ved bruk av Oligotex direkte mRNA Midi-sett (Qiagen) ved å følge instruksjonene til forhandleren.

Fremstilling av cDNA

cDNA ble laget fra 250 ng av det isolerte poly A⁺-RNA ved bruk av SMARTTM PCR cDNA-bibliotekkonstruksjonssett (Clontech) i henhold til protokollen anbefalt av forhandleren. I korthet ble den første kjeden cDNA laget
 20 ved å kombinere 250 ng poly A⁺-RNA med 10 pmol SMART-oligonukleotid (5'-TACGGCTGCGAGAAGACGACAGAAGGG-3') og 10 pmol CDS/3' PCR-primer (Oligo (dT) 30 N -1 N (N = A, G, C eller T; N -1 = A, G eller C)) i et sluttvolum på 5 μ l, og inkubert ved 72°C i 2 minutter, og så plassert direkte på is i 2 minutter for å denaturere RNA. Så ble enzym og buffer tilsatt reaksjonsblandingen til et slutt-
 25 volum på 10 μ l, bestående av 50 nM Tris/HCl, pH 8,3, 6 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 2 mM DTT, 1 mM dATP, dCTP, dGTP og dTTP henholdsvis og 200 U SuperScriptTM II revers transkriptase (Gibco BRL), og så inkubert ved 42°C i 1 time. Syntese av den andre kjeden ble gjort med PCR i et sluttvolum på 100 μ l, inneholdende 2 μ l av den første kjedereaksjonen som templat, 40 mM Tricine/KOH pH 9,2 (25°C), 15
 30 mM KOAc, 3,5 mM Mg(OAc)₂, 3,75 μ g/ml BSA, 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP og dTTP henholdsvis, 1 U Advantage cDNA-polymeraseblanding (Clontech), 0,2 μ M 5'-PCR-primer (5'-TACGGCTGCGAGAAGACGACAGAA-3') og CDS/3'-PCR-primer henholdsvis.

PCR-amplifikasjon ble utført i en GeneAmp 9700 termocykler (Perkin Elmer) ved 95°C i 1 minutt, etterfulgt av 16 sykluser ved 95°C i 15 sekunder og 68°C i 5 minutter.

ds cDNA polishing T 50 µl av amplifisert ds cDNA, 40 µg proteinase K ble tilsatt og inkubert ved 45°C i 1 time. Proteinase K ble inaktivert ved inkubering av blandingen ved 90°C i 8 minutter. For å butte enden av ds cDNA, ble 15 U av T4 DNA-polymerase tilsatt og inkubert ved 16°C i 30 minutter og 72°C i 10 minutter. Endelig ble ds cDNA etanolpresipitert og resuspendert i 10 µl H₂O. Alle rør ble holdt på is dersom ikke annet er angitt.

Danning av 300 bp-fragment av cUNG-genet

Degenererte oligonukleotidprimere ble designet fra to konserverte regioner (GQDPYH og VFLLWG) fra kjente UNG -aminosyresekvenser. Vanlig kodon for atlantisk torsk ble også vurdert når primerne ble utformet. UNG-fragmentet ble dannet ved PCR med torskelever cDNA som templat i et sluttvolum på 50 µl, inneholdende 10 mM Tris/HCl, pH 9,0 (25°C), 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 10 ng cDNA, 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP og dTTP henholdsvis, 2,0 µM oppstrømsprimer (5'-GGH-CAR-GAY-CCC-TAY-CA-3') og nedstrømsprimer (5'-DCC-CCA-SAG-SAG-RAA-VAC-3') henholdsvis og 2,5 U Taq-polymerase (Promega).

Nukleotidsymbolene som er anvendt er: A=adenin, C=cytosin, G=guanin, T=tymin, D=A+G+T, R=A+G, S=C+G, V=A+C+G, Y=C+T. PCR ble utført ved 94°C i 4 minutter, 30 sykluser av 94°C i 1 minutt, 60°C i 1 minutt og 72°C i 1 minutt, og et sluttekstensjonstrinn på 72°C i 5 minutter.

DNA-sekvensering

DNA-sekvensering ble utført med Amersham Pharmacia Biotech Thermo Sequenace Cy5 Dye Terminator Kit, ALFexpress™ DNA-sekvensator og ALFwin Sequence Analyzer versjon 2,10. Geler ble laget med Reprogel™ Long Read og Reproset UV-polymerisator. Alle gjenstander ble forhandlet fra Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sverige).

RACE-prosedyre

Ligering av adaptorer til cDNA ble utført som beskrevet i protokollen fra forhandler. I korthet, ble RACE-adaptorene ligert til cDNA i et totalvolum på 10 µl inneholdende 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 0,75 µg cDNA, 2 µM Marathon cDNA-adaptor (Clontech), 400 U T4 DNA-ligase. Reaksjonen ble inkubert ved 16°C i 16 timer og 5 minutter ved 70°C for å inaktivere ligase. Før RACE ble det adaptorligerte cDNA fortynnet 50 ganger i TE-buffer og denaturert ved 100°C i 2 minutter og plassert direkte på is.

Sekvensen dedusert fra 300 bp-fragmentet av UNG-genet ble benyttet for å designere to primere for både 3'- og 5'- rask amplifikasjon av cDNA-ender (RACE), med en liten overlappsregion mellom de to fragmentene som dannes. Både 3'- og 5'-RACE-reaksjonene ble utført i et volum på 50 µl med 1 µl av fortynnet cDNA med RACE-adaptorer som templat, 0,2 µM intern 3'- (5' - TGTACCGACATTGATGGCTTCAAGCAT-3') eller 5' - (5' - CCCATCCGCTTA-GATCTCCATGTCCAG-3') RACE-primere, henholdsvis, 0,2 µM AP1-primer (tilveiebragt av forhandler) (5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3'), 40 mM Tricine/KOH pH 9.2 (25°C), 15 mM KOAc, 3.5 mM Mg(OAc)₂, 3.75 µg/ml BSA, 0.2 mM av hver dATP, dCTP, dGTP and dTTP og 1U Advantage cDNA polymeraseblanding (Clontech). Amplifikasjon ble utført med en GeneAmp 9700 termocycler (Perkin Elmer), 94°C i 30 sekunder, fulgt av 5 sykluser av 94°C 5 sekunder og 72°C i 3 minutter, 5 sykluser av 94°C i 5 sekunder og 70°C i 3 minutter og 20 sykluser av 94°C i 5 sekunder 68°C 3 minutter.

Individuelle bånd ble renset fra en agarosegel og anvendt som templat i en ny PCR-reaksjon med de samme betingelser som over for å generere mer DNA.

Isolering av to ulike UNG-gener

Begge RACE-fragmenter dannet, ble sekvensert ved bruk av deres respektive interne RACE-primere. Undersøkelse av sekvensen av 5'-RACE-fragmentet indikerer en dobbeltsekvens vanskelig å lese nær 5'-enden av fragmentet. Imidlertid kommer det tilsyne kun én sekvens ved enden av fragmentet på grunn av en lang stor UTR i én av UNG-sekvensene, men ikke i den andre. En ny primer komplementær til denne 5'-enden, ble utformet (5'-

ATGGAATTCGATTGAGATTGGCGCCTTTGG -3') og en ny PCR-reaksjon ble utført med denne, og 5'-RACE-internprimeren, med 5'-RACE-fragmentet som templat. PCR ble utført i et sluttvolum på 50 µl med 40 mM Tricine/KOH pH 9.2 (25°C), 15 mM KOAc, 3.5 mM Mg(OAc)₂, 3.75 µg/ml BSA, 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP og dTTP henholdsvis, 1U Advantage cDNA polymeraseblanding (Clontech), 10 ng cDNA som templat og 0.2 µM oppstrøms- og nedstrømsprimere henholdsvis. Amplifikasjon ble utført i en GeneAmp 9700 thermocycler (Perkin Elmer), 94°C i 1 minutt, fulgt av 30 sykluser av 94°C i 30 sekunder, 60°C i 1 minutt og 72°C i 1 minutt.

Fragmentet ble sekvensert ved bruk av intern RACE-primer, og sekvensen ble trukket fra dobbeltsekvensregionen beskrevet over. En primer komplementær til 5p-enden av den underliggende sekvensen ble utformet (bestående av begge nukleotidene fra SMART-sekvensen og den gjenværende UNG-sekvensen), og en PCR-reaksjon med denne og den interne 5'-RACE-primeren ble utført. Det nye fragment ble sekvensert som beskrevet over. Fra de to ulike UNG-sekvensene i 5'-RACE-fragmentet, ble to sluttprimere (UNG1 og UNG2) laget for å isolere full-lengde UNG1 og UNG2 henholdsvis ved bruk av cDNA som templat og samme PCR-betingelsene som beskrevet over.

Konstruksjon av ekspresjonsvektorer

Det katalytiske domene av UNG-genet ble klonet i en ekspresjonsvektor pTrc99A inneholdende en sterk trc-promotor oppstrøms av et multippelt klonings-sete [77]. Flere ulike konstruksjoner ble laget ved PCR-amplifisering av genet ved bruk av dDNA som templat med oppstrøms- og nedstrømsprimere inneholdende EcoRI og Sall-restriksjons seter henholdsvis. DNA-fragmenter ble renset, spaltet med EcoRI og Sall og ligert inn i pTrc99A-ekspresjonsvektor. I korthet, ble PCR-fragmenter med restriksjons seter dannet i en PCR-reaksjon (50 µl) inneholdende 40 mM Tricine/KOH pH 9.2 (25°C), 15 mM KOAc, 3.5 mM Mg(OAc)₂, 3.75 µg/ml BSA, 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP og dTTP henholdsvis, 1U Advantage cDNA polymeraseblanding (Clontech), 10 ng cDNA som templat og 0.2 µM oppstrøms- og nedstrømsprimere henholdsvis. Amplifikasjon ble utført i en GeneAmp 9700 thermocycler (Perkin Elmer), 94°C i 1 minutt, etterfulgt av 30 sykluser av 94°C i 30

sekunder, 60°C i 1 minutt og 72°C i 2 minutter, og et sluttekstensjonstrinn på 72°C i 5 minutter. Individuelle bånd ble renset fra agarosegel og anvendt som templat i en ny PCR-reaksjon med de samme betingelser som beskrevet overfor, for å generere mer DNA. DNA ble renset under anvendelse av Quiaquick PCR-rensesett (Millipore) som beskrevet av forhandler og eluert i TE-buffer, pH 8.0. Restriksjonsenzymspalting ble utført i et sluttvolum på 30 µl inneholdende 1 µg innskutt DNA eller 0.25 µg pTrc99A vektor, 6 mM Tris/HCl, pH 7.9, 6 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 1 mM DTT (BufferD, Promega) og 3U av EcoRI og Sall. Blandingene ble inkubert ved 37°C i 3 timer, etterfulgt av to ganger fenol/-kloroformekstraksjon, etanolfelling og resuspendering i 5 µl H₂O. Ligeringer ble utført i et totalvolum på 10 µl inneholdende 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 100 U T4 DNA-ligase, 250 ng vektor DNA og 1 µg innskutt DNA og inkubert ved 16°C i 16 timer.

Kompetent *E. coli* JM105 (200 µl) ble transformert med ligeringsblandinger og dyrket på LB+ plater inneholdende 100 µg/ml ampicillin ved 37°C. Plasmid-DNA ble reisolert fra positive kloner og transformert i *E. coli* NR8052 benyttet for ekspresjon av rekombinant UNG.

Fire ulike konstruksjoner ble laget rcUNGΔ74 og rcUNGΔ74o og rcUNGΔ81 og rcUNGΔ81o hvor henholdsvis 74 og 81 av de N-terminale aminosyrene var fjernet. Disse har henholdsvis de samme lengder som human Δ77 og Δ84 (64). Δ74o og Δ81o konstruksjonene har kodoner som koder for arginin 87 og 88 optimalisert for ekspresjon i *E. coli*, ved å forandre dem fra AGA til CGT. Alle konstruksjoner ble gjort ved PCR som beskrevet over ved bruk av de følgende primere og templat:

rcUNGΔ74 : UDGL77 (5'- ACCATGGAATTCGCAAAGCAACGCCTGCA- 3')
og UDGEN2 (5'- GAGCTCGTCGACTTAGAGTGCCTCTCCAGTTTATAGG- 3') og 10 ng cDNA som templat.

rcUNGΔ81: UDGL84 (5'- ACCATGGAATTCTTCGGAGAGACTTGGAGAAGA – 3') og UDGEN2 og 10 ng cDNA som templat.

rcUNG Δ 74o : (5'- ATGGAATTCGCAAAAGCAACGCCTGCAGGTTTCGGA-
GAGACTTGGCGTCGTGAG – 3') og UDGEN2 og 1 ng rcUNG Δ 81o som
templat.

rcUNG Δ 81o : (5'- ATGGAATTCTTCGGAGAGACTTGGCGTCGTGAGCTGGC-
TGC – 3') og UDGEN2 og 10 ng cDNA som templat.

Småskalaekspressjon av uracil-DNA-glykosylase

Optimalisering av ekspressjon ble utført i 1 liter "riflet" erlenmeyerflasker med
100 ml LB+ medium med 100 μ g/ml ampicillin, inokulert med 5 ml av prekultur.
Celler ble indusert med 1 mM av IPTG ved OD600 = 2.0, og indusert ved
varierende lengde som indikert i figurtekstene. Ekspressjon ble undersøkt ved bruk
av ulike temperaturer (20°C, 25°C, 30°C og 37°C).

Betingelsene over ble også anvendt for å indusere ekspressjon ved ulike
IPTG-konsentrasjoner (1 mM, 0.5 mM, 0.1 mM og 0.01mM).

Fermenteringsbetingelser

Fermentering ble utført i en 10 liters Chemap CF 3000 fermentor (Sveits).
En 200 ml prekultur av *E.coli* NR8052 med pTrc99A o Δ 84-konstruksjonen ble
inokulert til 7 liter av LB-medium supplementert med 20 mM glukose og 100 μ g/ml
ampicillin. Celler ble dyrket til en OD600 på 2.0 og indusert i 8 timer med 1 mM
IPTG. Tilleggsglukose (3 x 50 ml av 20% glukose (vekt/volum)) ble supplert
under fermenteringen for å unngå glukosesulting. Celler ble høstet og sentrifugert
ved 10.000 g i 10 minutter. Cellepastaen ble frosset ved -70°C.

Rensing av rekombinant torske-UNG

Råekstrakt

Fra fermenteringen , ble 4 liter av *E. coli* NR8052-celler (68 g våt vekt)
resuspendert i 400 ml av ekstraksjonsbuffer (25 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 1 mM
EDTA, 1 % glycerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF pH 8,0). Cellene ble ødelagt ved å
utsette dem fem ganger før en forstøver ved bruk av 100 psi av nitrogen.

Ekstraktet ble sentrifugert 25.000 g i 10 minutter og supernatanten fjernet. Pelleten ble resuspendert i 100 ml av buffer A, og resentrifugert som beskrevet over. Supernatantene ble kombinert og filtrert gjennom glassull (460 ml).

5 Protaminsulfat

Til råekstraktet (460 ml), ble det tilsatt 60 ml av 2% protaminsulfat i buffer A (25 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % glycerol, pH 8.0) og inkubert ved 4°C i 5 minutter med røring. Løsningen ble sentrifugert ved 25.000 i 10 minutter, og supernatanten ble fjernet, 510 ml (fraksjon 1).

10

Q/S-sepharose

Protaminsulfatfraksjonen ble påsatt en Q-sepharose-kolonne (5.0/10) koblet med en S-sepharose-kolonne (2.6/10), begge ekvilibrert i buffer A ved bruk av en gjennomstrømningshastighet på 10 ml/minutt. Kolonnene ble vasket med 750 ml buffer A, og Q-sepharose-kolonnen ble så fjernet. S-sepharose-kolonnen ble vasket med ytterligere 550 ml buffer A + 60 mM NaCl, og en gradient på 60 til 400 mM NaCl i buffer A ble påsatt for å eluere kolonnen under anvendelse av en gjennomstrømningshastighet på 5 ml/minutt. Fraksjoner på 10 ml ble oppsamlet, og fraksjonene inneholdende UNG-aktivitet ble oppsamlet (fraksjon 2, 115 ml).

20

Blue sepharose FF

Fraksjon 2 ble fortynnet to ganger i buffer A og direkte påsatt en blue sepharose-kolonne (1,6/5,0), med en gjennomstrømningshastighet på 4 ml/minutt. Kolonnen ble så vasket med 30 ml av buffer A og 60 ml av buffer A + 110 mM NaCl, og eluert med 60 ml buffer A + 0.7 M NaCl. UNG-inneholdende fraksjoner ble oppsamlet (fraksjon 3, 24 ml).

25

Superdex 75

Fraksjon 3 ble konsentrert til 3 ml ved bruk av en Ultrafree 15 enhet (Millipore) og tilsatt på en superdex 75 kolonne (2.6/60) ekvilibrert i buffer A + 0.15 M NaCl. En gjennomstrømningshastighet på 2 ml/minutt ble benyttet, og fraksjoner på 5 ml ble oppsamlet. Fraksjoner inneholdende UNG-aktivitet ble oppsamlet (fraksjon 4, 30 ml).

30

Source 15Q

Superdex 75-fraksjonen ble diafiltrert i en Ultrafree 15 enhet (Millipore) og omtrent 2/3 av Superdex 75-fraksjonen ble påsatt Source 15Q-kolonnen (2.6/3.0) ekvibrert i buffer A ved romtemperatur. Kolonnen ble vasket med 60 ml buffer A + 60 mM NaCl, og så ble en gradient fra 60 til 210 mM NaCl i buffer A påsatt for å eluere kolonnen. Fraksjoner ble oppsamlet på is, og UNG-inneholdende fraksjoner ble oppsamlet (UNG-aktivitet eluerte mellom 105 til 145 mM NaCl).

Resultatene er gitt i sekvenslisten SEQ:ID:NO. 5 og 6 i form av sekvensene for cUNG1 og cUNG2, henholdsvis DNA-sekvenser og tilhørende translatiserte proteinsekvenser.

Ekspresjon

Ekspresjon av rcUNG med pTrc99A- Δ 81o i 7 liter skalafermenteringen ga et totalt utbytte på 413.480 enheter av rcUNG inneholdt i råekstraktet.

Rensing

Rensing av rekombinant cUNG (Δ 81o) (rcUNG) er oppsummert i tabell 1. Fra 4 liter av fermenteringsbatchen, ble 4,8 mg av rekombinant UNG renset til tilsynelatende homogenitet, og molekylvekten ble bestemt til 28 kD med SDS-PAGE. Den spesifikke aktiviteten av enzymet ble bestemt til 30.092 U/mg ved bruk av nick-generert substrat med standard testbetingelser.

Eksempel: "Carry-over-prevention"

Metode

Som en kontaminant, ble 0,5 ng av uracil-inneholdende templat DNA (761 bp-fragment dannet fra kationisk trypsinogen fra atlantisk laks (*Salmo salar*) [61], tilsatt til PCR-blandingen i et sluttvolum på 50 μ l inneholdende 10 mM Tris/HCl pH 9,0 (25°C), 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 10 ng cDNA, 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP og dTTP henholdsvis, 2,0 μ M oppstrøms- (OP5) og nedstrøms-primer (NP2) henholdsvis, og 1,0 U Taq-polymerase (Promega). UNG (4×10^{-3} eller $1,7 \times 10^{-2}$ U) ble tilsatt til PCR-blandingen og inkubert ved romtemperatur i 10 minutter.

Som negative kontroller, inneholdt én PCR-reaksjonsmikstur templat med tymidin erstattende uracil, og i én blanding erstattet vann UNG. Som en positiv kontroll, ble 1.7×10^{-3} U UNG fra *E. coli* benyttet.

Så ble PCR utført ved 94°C i 4 minutter, 30 sykluser av 94°C 1 minutt, 60°C i 1 minutt og 72°C i 1 minutt. Etter PCR'en, ble produktene analysert med agarosegelelektroforese.

PCR primersekvenser:

OP5:

5'-TCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTCCCATTGACGATGAGGATGA-3'

NP2:

5'-GTAGAATTCGGATCCATGTCTCCTCCAGTCTAGAT-3'

Resultat

Resultatet av eksperimentet i henhold til eksempelet er vist i fig. 9. Uracil-inneholdende templat ble degradert ved UNG i alle PCR-reaksjoner, mens reaksjonene enten uten UNG eller med tymin-inneholdende templat ga de forventede PCR-produktene. Resultatene i fig. 9 er vist som en figur av en agarosegel.

Tabell 1: Rensing av atalantisk torskelever uracil-DNA-glykosylase (rcUNG).

Trinn	Volum (ml)	Aktivitet _a (U/ml)	Total aktivitet U)	Protein kons. (mg/ml) _b	Totalt protein (mg)	Spesifikk aktivitet (U/mg)	Utbytte (%)	Ganger rensing
Råekstrakt	2000	0,086	172	4	8000	0,021	100	1
Q- Sepharose	2340	0,073	170	1,66	3884	0,044	99	2
FF								
S- Sepharose	55	1,796	98,8	0,155	8,53	11,6	58	540
FF								
Heparin Sepharose	20	2,775	55,5	0,081	1,62	34,3	32	1597
Poly-U Sepharose	70	0,446	31,2	ND _c	ND	ND	18	ND
Superdex75	3	1,138	3,41	0,003	0,009	379	2	17679

a) Enzymaktivitet ble målt som beskrevet under standardtest i materialer og metoder ved bruk av nick-substrat.

b) Proteinkonsentrasjon ble bestemt som beskrevet i materialer og metoder.

c) Proteinkonsentrasjon var for lav til å måle.

Tabell 2: Substratspesifisitet ssDNA mot dsDNA

Substrat	cpm	% aktivitet	Ganger
dsNick	586	54	1,0
ssNick	1078	100	1,8
dsPCR	1158	52	1,0
ssPCR	2214	100	1,9

REFERANSER

1. Lindahl, T., *An N-glycosidase from Escherichia coli that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues*. Proc Natl Acad Sci, USA, 1974. **71**(9): p. 3649-53.
2. Lindahl, T., *DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1979. **22**: p. 135-92.
3. Kubota, Y., et al., *Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein*. Embo J., 1996. **15**(23): p. 6662-70.
4. Nicholl, I.D., K. Nealon, and M.K. Kenny, *Reconstitution of human base excision repair with purified proteins*. Biochemistry, 1997. **36**(24): p. 7557-66.
5. Parikh, S.S., C.D. Mol, and J.A. Tainer, *Base excision repair enzyme family portrait: integrating the structure and chemistry of an entire DNA repair pathway*. Structure, 1997. **5**(12): p. 1543-50.
6. Slupphaug, G., et al., *Cell cycle regulation and in vitro hybrid arrest analysis of the major human uracil-DNA glycosylase*. Nucleic Acids Res., 1991. **19**(19): p. 5131-7.
7. Muller, S.J. and S. Caradonna, *Isolation and characterization of a human cDNA encoding uracil-DNA glycosylase*. Biochim. Biophys. Acta, 1991. **1088**(2): p. 197-207.
8. Muller Weeks, S.J. and S. Caradonna, *Specific association of cyclin-like uracil-DNA glycosylase with the proliferating cell nuclear antigen*. Exp. Cell Res., 1996. **226**(2): p. 346-55.
9. Haushalter, K.A., et al., *Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors*. Curr. Biol., 1999. **9**(4): p. 174-85.
10. Gallinari, P. and J. Jiricny, *A new class of uracil-DNA glycosylases related to human thymine-DNA glycosylase*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 735-8.
11. Barrett, T.E., et al., *Crystal structure of a G:T/U mismatch-specific DNA glycosylase: mismatch recognition by complementary-strand interactions*. Cell, 1998. **92**(1): p. 117-29.

12. Sandigursky, M. and W.A. Franklin, *Thermostable uracil-DNA glycosylase from Thermotoga maritima a member of a novel class of DNA repair enzymes*. Curr. Biol., 1999. **9**(10): p. 531-4.
13. Krokan, H.E., R. Standal, and G. Slupphaug, *DNA glycosylases in the base excision repair of DNA*. Biochem. J., 1997. **325**(Pt 1): p. 1-16.
14. Higley, M. and R.S. Lloyd, *Processivity of uracil DNA glycosylase*. Mutat. Res., 1993. **294**(2): p. 109-16.
15. Bennett, S.E., R.J. Sanderson, and D.W. Mosbaugh, *Processivity of Escherichia coli and rat liver mitochondrial uracil-DNA glycosylase is affected by NaCl concentration*. Biochemistry, 1995. **34**(18): p. 6109-19.
16. Purmal, A.A., et al., *Uracil DNA N-glycosylase distributively interacts with duplex polynucleotides containing repeating units of either TGGCCAAGCU or TGGCCAAGCTTGGCCAAGCU*. J. Biol. Chem., 1994. **269**(35): p. 22046-53.
17. Colson, P. and W.G. Verly, *Intracellular localization of rat-liver uracil-DNA glycosylase. Purification and properties of the chromatin enzyme*. Eur. J. Biochem., 1983. **134**(3): p. 415-20.
18. Domena, J.D. and D.W. Mosbaugh, *Purification of nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylase from rat liver. Identification of two distinct subcellular forms*. Biochemistry, 1985. **24**(25): p. 7320-8.
19. Domena, J.D., et al., *Purification and properties of mitochondrial uracil-DNA glycosylase from rat liver*. Biochemistry, 1988. **27**(18): p. 6742-51.
20. Seal, G., P. Arenaz, and M.A. Sirover, *Purification and properties of the human placental uracil DNA glycosylase*. Biochim. Biophys. Acta., 1987. **925**(2): p. 226-33.
21. Wittwer, C.U., G. Bauw, and H.E. Krokan, *Purification and determination of the NH₂-terminal amino acid sequence of uracil-DNA glycosylase from human placenta*. Biochemistry, 1989. **28**(2): p. 780-4.
22. Krokan, H. and C.U. Wittwer, *Uracil DNA-glycosylase from HeLa cells: general properties, substrate specificity and effect of uracil analogs*. Nucleic Acids Res., 1981. **9**(11): p. 2599-613.
23. Wittwer, C.U. and H. Krokan, *Uracil-DNA glycosylase in HeLa S3 cells: interconvertibility of 50 and 20 kDa forms and similarity of the nuclear and mitochondrial form of the enzyme*, Biochim. Biophys. Acta., 1985. **832**(3): p. 308-18.

24. Myrnes, B. and C.U. Wittwer, *Purification of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase and uracil-DNA glycosylase, the latter to apparent homogeneity*. Eur. J. Biochem., 1988. **173**(2): p. 383-7.
25. Caradonna, S., et al., *Affinity purification and comparative analysis of two distinct human uracil-DNA glycosylases*. Exp. Cell Res., 1996. **222**(2): p. 345-59.
26. Muller-Weeks, S., B. Mastran, and S. Caradonna, *The nuclear isoform of the highly conserved human uracil-DNA glycosylase is an Mr 36,000 phosphoprotein*. J. Biol. Chem., 1998. **273**(34): p. 21909-17.
27. Seal, G., R.J. Tallarida, and M.A. Sirover, *Purification and properties of the uracil DNA glycosylase from Bloom's syndrome*. Biochim. Biophys. Acta., 1991. **1097**(4): p. 299-308.
28. Caradonna, S.J. and Y.C. Cheng, *Uracil DNA-glycosylase. Purification and properties of this enzyme isolated from blast cells of acute myelocytic leukemia patients*. J. Biol. Chem., 1980. **255**(6): p. 2293-300.
29. Talpaert-Borle, M., L. Clerici, and F. Campagnari, *Isolation and characterization of a uracil-DNA glycosylase from calf thymus*. J. Biol. Chem., 1979. **254**(14): p. 6387-91.
30. Talpaert-Borle, M., F. Campagnari, and D.M. Creissen, *Properties of purified uracil-DNA glycosylase from calf thymus. An in vitro study using synthetic DNA-like substrates*. J. Biol. Chem., 1982. **257**(3): p. 1208-14.
31. Guyer, R.B., J.M. Nonnemaker, and R.A. Deering, *Uracil-DNA glycosylase activity from Dictyostelium discoideum*. Biochim. Biophys. Acta., 1986. **868**(4): p. 262-4.
32. Crosby, B., et al., *Purification and characterization of a uracil-DNA glycosylase from the yeast. Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res., 1981. **9**(21): p. 5797-809.
33. Blaisdell, P. and H. Warner, *Partial purification and characterization of a uracil-DNA glycosylase from wheat germ*. J. Biol. Chem., 1983. **258**(3): p. 1603-9.
34. Talpaert-Borle, M. and M. Liuzzi, *Base-excision repair in carrot cells. Partial purification and characterization of uracil-DNA glycosylase and apurinic/aprimidinic endodeoxyribonuclease*. Eur. J. Biochem., 1982. **124**(3): p. 435-40.

35. Birch, D.J. and A.G. McLennan, *Uracil-DNA glycosylase in developing embryos of the brine shrimp (Artemia salina)*. Biochem. Soc. Trans., 1980. **8**(6): p. 730-1.
36. Lindahl, T., et al., *DNA N-glycosidases: properties of uracil-DNA glycosidase from Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 1977. **252**(10): p. 3286-94.
37. Cone, R., et al., *Partial purification and characterization of a uracil DNA N-glycosidase from Bacillus subtilis*. Biochemistry, 1977. **16**(14): p. 3194-201.
38. Williams, M.V. and J.D. Pollack, *A mollicute (mycoplasma) DNA repair enzyme: purification and characterization of uracil-DNA glycosylase*. J. Bacteriol., 1990. **172**(6): p. 2979-85.
39. Kaboev, O.K., et al., *Uracil-DNA glycosylase from Bacillus stearothermophilus*. FEBS Lett., 1981. **132**(2): p. 337-40.
40. Purnapatre, K. and U. Varshney, *Uracil DNA glycosylase from Mycobacterium smegmatis and its distinct biochemical properties*. Eur J Biochem., 1998. **256**(3): p. 580-8.
41. Kaboev, O.K., L.A. Luchkina, and T.I. Kuziakina, *Uracil-DNA glycosylase of thermophilic Thermothrix thiopara*. J Bacteriol, 1985. **164**(1): p. 421-4.
42. Masters, C.I., B.E. Moseley, and K.W. Minton, *AP endonuclease and uracil DNA glycosylase activities in Deinococcus radiodurans*. Mutat. Res., 1991. **254**(3): p. 263-72.
43. Koulis, A., et al., *Uracil-DNA glycosylase activities in hyperthermophilic micro-organisms*. FEMS Microbiol. Lett., 1996. **143**(2-3): p. 267-71.
44. Leblanc, J.P., et al., *Uracil-DNA glycosylase. Purification and properties of uracil-DNA glycosylase from Micrococcus luteus*. J Biol Chem, 1982. **257**(7): p. 3477-83.
45. Sobek, H., et al., *Heat-labile uracil-DNA glycosylase: purification and characterization*. FEBS Lett., 1996. **388**(1): p. 1-4.
46. Foher, F., et al., *Herpes simplex virus type 1 uracil-DNA glycosylase: isolation and selective inhibition by novel uracil derivatives*. Biochem J., 1993. **292**(Pt 3): p. 883-9.
47. Winters, T.A. and M.V. Williams, *Purification and characterization of the herpes simplex virus type 2-encoded uracil-DNA glycosylase*. Virology, 1993. **195**(2): p. 315-26.

48. Slupphaug, G., *et al.*, *Nuclear and mitochondrial forms of human uracil-DNA glycosylase are encoded by the same gene*. *Nucleic Acids Res.*, 1993. **21**(11): p. 2579-84.
49. Nilsen, H., *et al.*, *Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene*. *Nucleic Acids Res.*, 1997. **25**(4): p. 750-5.
50. Bharati, S., *et al.*, *Human mitochondrial uracil-DNA glycosylase preform (UNG1) is processed to two forms one of which is resistant to inhibition by AP sites*. *Nucleic Acids Res.*, 1998. **26**(21): p. 4953-9.
51. Haug, T., *et al.*, *Regulation of expression of nuclear and mitochondrial forms of human uracil-DNA glycosylase*. *Nucleic Acids Res.*, 1998. **26**(6): p. 1449-57.
52. Otterlei, M., *et al.*, *Nuclear and mitochondrial splice forms of human uracil-DNA glycosylase contain a complex nuclear localisation signal and a strong classical mitochondrial localisation signal, respectively*. *Nucleic Acids Res.*, 1998. **26**(20): p. 4611-7.
53. Mol, C.D., *et al.*, *Crystal structure and mutational analysis of human uracil-DNA glycosylase: structural basis for specificity and catalysis [see comments]*. *Cell*, 1995. **80**(6): p. 869-78.
54. Savva, R., *et al.*, *The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase*. *Nature*, 1995. **373**(6514): p. 487-93.
55. Ravishankar, R., *et al.*, *X-ray analysis of a complex of Escherichia coli uracil DNA glycosylase (EcUDG) with a proteinaceous inhibitor. The structure elucidation of a prokaryotic UDG*. *Nucleic Acids Res.*, 1998. **26**(21): p. 4880-7.
56. Slupphaug, G., *et al.*, *A nucleotide-flipping mechanism from the structure of human uracil-DNA glycosylase bound to DNA [see comments]*. *Nature*, 1996. **384**(6604): p. 87-92.
57. Parikh, S.S., *et al.*, *Base excision repair initiation revealed by crystal structures and binding kinetics of human uracil-DNA glycosylase with DNA*. *Embo J.*, 1998. **17**(17): p. 5214-26.
58. Feller, G. and C. Gerday, *Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation*. *Cell Mol. Life Sci.*, 1997. **53**(10): p. 830-41.
59. Kwok S, Higuchi R., *Nature* 1989, **339**:237-8.
60. Longo MC, Berningr MS, Hartley JL, *Gene* 1990, **93**:125-8.

61. Male, R., *et al.*, *Molecular cloning and characterization of anionic and cationic variants of trypsin from Atlantic salmon*. Eur. J. Biochem., 1995. **232**(2): p. 677-85.
62. Wang, K.T. and I.S. Wang, *Polyamide-layer chromatography of nucleic acid bases and nucleosides*. Biochim. Biophys. Acta., 1967. **142**(1): p. 280-1.
63. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem., 1976. **72**: p. 248-54.
64. Slupphaug, G., *et al.*, *Properties of a recombinant human uracil-DNA glycosylase from the UNG gene and evidence that UNG encodes the major uracil-DNA glycosylase*. Biochemistry, 1995. **34**(1): p. 128-38.
65. Bennett, S.E., M.I. Schimerlik, and D.W. Mosbaugh, *Kinetics of the uracil-DNA glycosylase/inhibitor protein association. Ung interaction with Ugi, nucleic acids, and uracil compounds*. J Biol Chem, 1993. **268**(36): p. 26879-85.
66. Karran, P., R. Cone, and E.C. Friedberg, *Specificity of the bacteriophage PBS2 induced inhibitor of uracil-DNA glycosylase*. Biochemistry, 1981. **20**(21): p. 6092-6.
67. Mol, C.D., *et al.*, *Crystal structure of human uracil-DNA glycosylase in complex with a protein inhibitor: protein mimicry of DNA*. Cell, 1995. **82**(5): p. 701-8.
68. Savva, R. and L.H. Pearl, *Nucleotide mimicry in the crystal structure of the uracil-DNA glycosylase-uracil glycosylase inhibitor protein complex*. Nat Struct Biol, 1995. **2**(9): p. 752-7.
69. Lohman, T.M., *Kinetics of protein-nucleic acid interactions: use of salt effects to probe mechanisms of interaction*. CRC Crit. Rev. Biochem., 1986. **19**(3): p. 191-245.
70. von Hippel, P.H. and O.G. Berg, *Facilitated target location in biological systems*. J. Biol. Chem., 1989. **264**(2): p. 675-8.
71. Dodson, M.L., M.L. Michaels, and R.S. Lloyd, *Unified catalytic mechanism for DNA glycosylases*. J. Biol. Chem., 1994. **269**(52): p. 32709-12.
72. Hamilton, R.W. and R.S. Lloyd, *Modulation of the DNA scanning activity of the Micrococcus luteus UV endonuclease*. J. Biol. Chem., 1989. **264**(29): p. 17422-7.

73. Outzen, H., et al., *Temperature and pH sensitivity of trypsins from Atlantic salmon (Salmo salar) in comparison with bovine and porcine trypsin*. Comp Biochem Physiol B Biochem. Mol. Biol., 1996. **115**(1): p. 33-45.
74. Berglund, G.I., et al., *Purification and characterization of pancreatic elastase from North Atlantic salmon (Salmo salar)*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol, 1998. **7**(2): p. 105-14.
75. Kunkel TA, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1985, **82**:488-92.
76. Varshney U, van de Sande JH, Nucleic Acids Res., 1989, **17**:813.
77. Amann E., Ochs B., Abel KJ, Gene 1988, **69**:301-15.

SEKVENSLISTE

SEQ:ID:NR. 1:

DNA-sekvens av cUNG1 hvor A=adenin, T=tymidin, G=guanin, C=cytosin. Enkelt-
kjedevarietet.

GACATCCGCTTGCAAATATGTTGTTCAAG

TTAGGGTTATGCCAAAGATGCATATCATCAAATCGGGTYTTACCAGGTTTA
CTAATTCGCCAACTTTATGTTTTTCTAAATTAATGAAGATAACGCCGAAG
AAACTGAGGTCTCAAATGTGGAACAAAAGACGTCATCGCCACAGCTTTCA
GTGGAGCAGCTGGAAAGAATGGCCAAAAATAAGAAAGCAGCGCTTGACAAG
ATTAGAGCAAAGCAACGCCTGCAGGTTTCGGAGAGACTTGGAGAAGAGAG
CTGGCTGCAGAGTTTGAAAAGCCATACTTCAAACAATTGATGTCCTTTGTA
GCTGATGAGAGGAGCCGTCACACCGTCTACCCACCGGCTGATCAAGTGTAC
AGTTGGACAGAGATGTGTGACATTCAGATGTGAAAGTAGTGATTCTAGGC
CAGGACCCCTTACCACGGTCCCAACCAAGCACATGGACTCTGTTTCAGTGTG
CAAAAGCCAGTTCCCCCTCCCCCAGTCTCGTGAACATATACAAAGAATTG
TGTACCGACATTGATGGCTTCAAGCATCCTGGACATGGAGATCTAAGCGGA
TGGGCAAAACAAGGGGTGCTGCTGCTTAACGCGGTGCTGACCGTGCGGGCC
CATCAGGCCAACTCCCAAGGACAGAGGCTGGGAGACCTTCACCGACGCT
GTGATCAAGTGGCTGAGCGTCAACCGGAAGGAGTGGTTTTCTGTTGTGG
GGCTCATACGCCCATAGAAGGGAGCGACCATCGACAGGAAACGTCACCAT
GTCCTGCAAGCTGTTTCATCCATCTCCTTTGTCTGCTCATCGTGGGTTCCCTT
GGTTGTAAGCACTTCTCCAAGGCTAACGGGCTGCTGAAACTATCTGGGACG
GAGCCTATAAACTGGAGAGCACTCTAACTCTTTATGCTGCCTTATACTGTT
AACTGTTTTAAGATGAACATCACACTATATTTCTACAGCTTTTCCAAGTT
CAAACCAATCTATAAGCTTTTCATTTGTCTTTTGGAAATGATGCTGCTTTTGG
TCGGTTTTAGATACTTAAACACTTTACCACTCTGCCATGTTGACTCATGT
TCAGTCAATATAACTTTTCAAACTTGAACAAAAATGTTATTTTATAATTGA
TTATATTCTGTACATTAAAGATTGTTTTTTTCCCAGGCTGTTTCATAGGTA
CTAGGATATTAACTGTTATTAACTATTTTCCATGATGTCAACTGCTTAA
GTTTTTATGCAGAAATAAATTATATATTTA

SEQ:ID:NR. 2:

DNA-sekvens av cUNG2 hvor A=adenin, T=tymidin, G=guanin, C=cytosin. Enkelt-kjedevarietet.

GATGGTTT TAGGAGGATAGTACTTTGACACTGGTTAGCGAAGGGGAAAACG
GAGTTATTGTGCATATCGTTTTAGCCCTACGTTTAAAAAATGATTGGTCAA
CAGCATATCAACTCTTTCTTCTCACCAGTTTCAAAAAGAGAGTTTCAAAG
GAATTAGGTAAAACCGAAAAGCATGCCGAAGAAGTT CAGATAACGCCGAAG
AAACTGAGGTCCTCAAATGTGGAACAAAAGACGTCATCGCCACAGCTTTCA
GTGGAGCAGCTGGAAAGAATGGCCAAAATAAGAAAGCAGCGCTTGACAAG
ATTAGAGCAAAGCAACGCCTGCAGGTTTTCGGAGAGACTTGGAGAAGAGAG
CTGGCTGCAGAGTTTGAAAAGCCATACTTCAAACAATTGATGTCCTTTGTA
GCTGATGAGAGGAGCCGTCACACCGTCTACCCACCGGCTGATCAAGTGTA
AGTTGGACAGAGATGTGTGACATTCAAGATGTGAAAGTAGTGATTCTAGGC
CAGGACCCCTTACCACGGTCCCAACCAAGCACATGGACTCTGTTTCAGTGTG
CAAAGCCAGTTCCCCCTCCCCCAGTCTCGTGAACATATACAAAGAATTG
TGTACCGACATTGATGGCTTCAAGCATCCTGGACATGGAGATCTAAGCGGA
TGGGCAAACAAGGGGTGCTGCTGCTTAACGCGGTGCTGACCGTGCGGGCC
CATCAGGCCAACTCCCACAAGGACAGAGGCTGGGAGACCTTACCGACGCT
GTGATCAAGTGGCTGAGCGTCAACCGGGAAGGAGTGGTTTTCTGTTGTGG
GGCTCATACGCCCATAAGAAGGGAGCGACCATCGACAGGAAACGTCACCAT
GTCTTGCAAGCTGTTTCATCCATCTCCTTTGTCTGCTCATCGTGGGTTCTTT
GGTTGTAAGCACTTCTCCAAGGCTAACGGGCTGCTGAAACTATCTGGGACG
GAGCCTATAAACTGGAGAGCACTCTAACTCTTTATGCTGCCTTATACTGTT
AACTGTTTTAAGATGAACATCACACTATATTTTCTACAGCTTTTCCAAGTT
CAAACCAATCTATAAGCTTTCATTTGTCTTTTGGAAATGATGCTGCTTTTGG
TCGGTTTTAGATACTTAAACACTTTACCACTCTGCCATGTTGACTCATGT
TCAGTCAATATAACTTTCACAACTTGAACAAAATGTTATTTTATAATTGA
TTATATTCTGTACATTAAAGATTGTTTTTTTCCAGGCTGTTTCATAGGTA
CTAGGATATTAACTGTTATTAACTTATTTTCCATGATGTCAACTGCTTAA
GTTTTTATGCAGAAATAAATTATATATTTA

SEQ:ID:NR. 3:

Aminosyresekvens til cUNG1. Konvensjonell én-bokstavbetegning av aminosyrer.

```

M L F K
L G L C Q R C I S S N R V L P G L
L I P Q T L C F S K L M K I T P K
K L R S S N V E Q K T S S P Q L S
V E Q L E R M A K N K K A A L D K
I R A K A T P A G F G E T W R R E
L A A E F E K P Y F K Q L M S F V
A D E R S R H T V Y P P A D Q V Y
S W T E M C D I Q D V K V V I L G
Q D P Y H G P N Q A H G L C F S V
Q K P V P P P P S L V N I Y K E L
C T D I D G F K H P G H G D L S G
W A K Q G V L L L N A V L T V R A
H Q A N S H K D R G W E T F T D A
V I K W L S V N R E G V V F L L W
G S Y A H K K G A T I D R K R H H
V L Q A V H P S P L S A H R G F L
G C K H F S K A N G L L K L S G T
E P I N W R A L

```

SEQ.ID.NR. 4:

Aminosyresekvens til cUNG2. Konvensjonell én-bokstavbetegning av aminosyrer.

M I G Q
Q H I N S F F S P V S K K R V S K
E L G K T E K H A E E V Q I T P K
K L R S S N V E Q K T S S P Q L S
V E Q L E R M A K N K K A A L D K
I R A K A T P A G F G E T W R R E
L A A E F E K P Y F K Q L M S F V
A D E R S R H T V Y P P A D Q V Y
S W T E M C D I Q D V K V V I L G
Q D P Y H G P N Q A H G L C F S V
Q K P V P P P P S L V N I Y K E L
C T D I D G F K H P G H G D L S G
W A K Q G V L L L N A V L T V R A
H Q A N S H K D R G W E T F T D A
V I K W L S V N R E G V V F L L W
G S Y A H K K G A T I D R K R H H
V L Q A V H P S P L S A H R G F L
G C K H F S K A N G L L K L S G T
E P I N W R A L

SEQ:ID:NR. 5**DNA-sekvens og aminosyresekvens tilhørende translasjonsprotein av cUNG1**

```

gacatccgcttgcaaat  ATG  TTG  TTC  AAG                                29
                                M    L    F    K
                                1
TTA GGG TTA  TGC CAA AGA TGC ATA TCA TCA AAT CGG GTY TTA CCA GGT TTA  80
L   G   L   C   Q   R   C   I   S   S   N   R   V   L   P   G   L
5                                10                                15                                20

CTA ATT CCC CAA ACT TTA TGT TTT TCT AAA TTA ATG AAG ATA ACG CCG AAG  131
L   I   P   Q   T   L   C   F   S   K   L   M   K   I   T   P   K
                                25                                30                                35

AAA CTG AGG TCC TCA AAT GTG GAA CAA AAG ACG TCA TCG CCA CAG CTT TCA  182
K   L   R   S   S   N   V   E   Q   K   T   S   S   P   Q   L   S
                                40                                45                                50                                55

GTG GAG CAG CTG GAA AGA ATG GCC AAA AAT AAG AAA GCA GCG CTT GAC AAG  233
V   E   Q   L   E   R   M   A   K   N   K   K   A   A   L   D   K
                                60                                65                                70

ATT AGA GCA AAA GCA ACG CCT GCA GGT TTC GGA GAG ACT TGG AGA AGA GAG  284
I   R   A   K   A   T   P   A   G   F   G   E   T   W   R   R   E
                                75                                80                                85

CTG GCT GCA GAG TTT GAA AAG CCA TAC TTC AAA CAA TTG ATG TCC TTT GTA  335
L   A   A   E   F   E   K   P   Y   F   K   Q   L   M   S   F   V
                                90                                95                                100                                105

GCT GAT GAG AGG AGC CGT CAC ACC GTC TAC CCA CCG GCT GAT CAA GTG TAC  386
A   D   E   R   S   R   H   T   V   Y   P   P   A   D   Q   V   Y
                                110                                115                                120

AGT TGG ACA GAG ATG TGT GAC ATT CAA GAT GTG AAA GTA GTG ATT CTA GGC  437
S   W   T   E   M   C   D   I   Q   D   V   K   V   V   I   L   G
                                125                                130                                135                                140

CAG GAC CCT TAC CAC GGT CCC AAC CAA GCA CAT GGA CTC TGT TTC AGT GTG  488
Q   D   P   Y   H   G   P   N   Q   A   H   G   L   C   F   S   V
                                145                                150                                155

CAA AAG CCA GTT CCC CCT CCC CCC AGT CTC GTG AAC ATA TAC AAA GAA TTG  539
Q   K   P   V   P   P   P   S   L   V   N   I   Y   K   E   L
                                160                                165                                170

TGT ACC GAC ATT GAT GGC TTC AAG CAT CCT GGA CAT GGA GAT CTA AGC GGA  590
C   T   D   I   D   G   F   K   H   P   G   H   G   D   L   S   G
175                                180                                185                                190

TGG GCA AAA CAA GGG GTG CTG CTG CTT AAC GCG GTG CTG ACC GTG CGG GCC  641
W   A   K   Q   G   V   L   L   L   N   A   V   L   T   V   R   A
                                195                                200                                205

```

```

CAT CAG GCC AAC TCC CAC AAG GAC AGA GGC TGG GAG ACC TTC ACC GAC GCT 692
H  Q  A  N  S  H  K  D  R  G  W  E  T  F  T  D  A
210                215                220                225

GTG ATC AAG TGG CTG AGC GTC AAC CGG GAA GGA GTG GTT TTC CTG TTG TGG 743
V  I  K  W  L  S  V  N  R  E  G  V  V  F  L  L  W
                230                235                240

GGC TCA TAC GCC CAT AAG AAG GGA GCG ACC ATC GAC AGG AAA CGT CAC CAT 794
G  S  Y  A  H  K  K  G  A  T  I  D  R  K  R  H  H
                245                250                255

GTC TTG CAA GCT GTT CAT CCA TCT CCT TTG TCT GCT CAT CGT GGG TTC CTT 845
V  L  Q  A  V  H  P  S  P  L  S  A  H  R  G  F  L
260                265                270                275

GGT TGT AAG CAC TTC TCC AAG GCT AAC GGG CTG CTG AAA CTA TCT GGG ACG 896
G  C  K  H  F  S  K  A  N  G  L  L  K  L  S  G  T
                280                285                290

GAG CCT ATA AAC TGG AGA GCA CTC TAA ctctttatgctgccttatactgtt 947
E  P  I  N  W  R  A  L  *
295                300

```

```

aactgttttaagatgaacatcacactatattttctacagcttttccaagtt 998
caaaccaatctataagctttcatttgtcttttggaatgatgctgcttttgg 1049
tcgggttttagatacttaaaacactttaccactctgccatggttgactcatgt 1100
tcagtcaatataactttcacaacttgaacaaaaatgtttattttataattga 1151
ttatatctgtacattaaagattgtttttttccaggctgtttcataggta 1202
ctaggatattaaactgttattaacctattttccatgatgtcaactgcttaa 1253
gtttttatgcagaaataaattatatattta 1283

```

SEQ:ID:NR. 6

DNA-sekvens og aminosyresekvens tilhørende translatert protein cUNG2

```

gatggtttaggaggatagtagctttgacactgggttagcgaaggggaaaacg 50

gagttattgtgcatatcgtttttagccctacgttttaaaaa ATG ATT GGT CAA 101
M I G Q
1
CAG CAT ATC AAC TCT TTC TTC TCA CCA GTT TCA AAA AAG AGA GTT TCA AAG 152
Q H I N S F F S P V S K K R V S K
5                10                15                20

GAA TTA GGT AAA ACC GAA AAG CAT GCC GAA GAA GTT CAG ATA ACG CCG AAG 203
E L G K T E K H A E E V Q I T P K
25                30                35
AAA CTG AGG TCC TCA AAT GTG GAA CAA AAG ACG TCA TCG CCA CAG CTT TCA 254
K L R S S N V E Q K T S S P Q L S
40                45                50                55

GTG GAG CAG CTG GAA AGA ATG GCC AAA AAT AAG AAA GCA GCG CTT GAC AAG 305
V E Q L E R M A K N K K A A L D K

```

60												65												70												
ATT	AGA	GCA	AAA	GCA	ACG	CCT	GCA	GGT	TTC	GGA	GAG	ACT	TGG	AGA	AGA	GAG	356																			
I	R	A	K	A	T	P	A	G	F	G	E	T	W	R	R	E																				
75				80				85																												
CTG	GCT	GCA	GAG	TTT	GAA	AAG	CCA	TAC	TTC	AAA	CAA	TTG	ATG	TCC	TTT	GTA	407																			
L	A	A	E	F	E	K	P	Y	F	K	Q	L	M	S	F	V																				
90				95				100				105																								
GCT	GAT	GAG	AGG	AGC	CGT	CAC	ACC	GTC	TAC	CCA	CCG	GCT	GAT	CAA	GTG	TAC	458																			
A	D	E	R	S	R	H	T	V	Y	P	P	A	D	Q	V	Y																				
110				115				120																												
AGT	TGG	ACA	GAG	ATG	TGT	GAC	ATT	CAA	GAT	GTG	AAA	GTA	GTG	ATT	CTA	GGC	509																			
S	W	T	E	M	C	D	I	Q	D	V	K	V	V	I	L	G																				
125				130				135				140																								
CAG	GAC	CCT	TAC	CAC	GGT	CCC	AAC	CAA	GCA	CAT	GGA	CTC	TGT	TTC	AGT	GTG	560																			
Q	D	P	Y	H	G	P	N	Q	A	H	G	L	C	F	S	V																				
145				150				155																												
CAA	AAG	CCA	GTT	CCC	CCT	CCC	CCC	AGT	CTC	GTG	AAC	ATA	TAC	AAA	GAA	TTG	611																			
Q	K	P	V	P	P	P	P	S	L	V	N	I	Y	K	E	L																				
160				165				170																												
TGT	ACC	GAC	ATT	GAT	GGC	TTC	AAG	CAT	CCT	GGA	CAT	GGA	GAT	CTA	AGC	GGA	662																			
C	T	D	I	D	G	F	K	H	P	G	H	G	D	L	S	G																				
175				180				185				190																								
TGG	GCA	AAA	CAA	GGG	GTG	CTG	CTG	CTT	AAC	GCG	GTG	CTG	ACC	GTG	CGG	GCC	713																			
W	A	K	Q	G	V	L	L	L	N	A	V	L	T	V	R	A																				
195				200				205																												
CAT	CAG	GCC	AAC	TCC	CAC	AAG	GAC	AGA	GGC	TGG	GAG	ACC	TTC	ACC	GAC	GCT	764																			
H	Q	A	N	S	H	K	D	R	G	W	E	T	F	T	D	A																				
210				215				220				225																								
GTG	ATC	AAG	TGG	CTG	AGC	GTC	AAC	CGG	GAA	GGA	GTG	GTT	TTC	CTG	TTG	TGG	815																			
V	I	K	W	L	S	V	N	R	E	G	V	V	F	L	L	W																				
230				235				240																												
GGC	TCA	TAC	GCC	CAT	AAG	AAG	GGA	GCG	ACC	ATC	GAC	AGG	AAA	CGT	CAC	CAT	866																			
G	S	Y	A	H	K	K	G	A	T	I	D	R	K	R	H	H																				
245				250				255																												
GTC	TTG	CAA	GCT	GTT	CAT	CCA	TCT	CCT	TTG	TCT	GCT	CAT	CGT	GGG	TTC	CTT	917																			
V	L	Q	A	V	H	P	S	P	L	S	A	H	R	G	F	L																				
260				265				270				275																								
GGT	TGT	AAG	CAC	TTC	TCC	AAG	GCT	AAC	GGG	CTG	CTG	AAA	CTA	TCT	GGG	ACG	968																			
G	C	K	H	F	S	K	A	N	G	L	L	K	L	S	G	T																				
280				285				290																												
GAG	CCT	ATA	AAC	TGG	AGA	GCA	CTC	TAA	ctctttatgctgccttatactggt								1019																			
E	P	I	N	W	R	A	L	*																												

295

300

```
aactggt ttaagatgaacatcacactatattttctacagcttttccaagtt 1070
caaaccaatctataagctttcatttgtcttttggaatgatgctgcttttgg 1121
tcgggtt tagatacttaaaacactttaccactctgccatgttgactcatgt 1172
tcagtcaatataactttcacaacttgaacaaaaatgttattttataattga 1223
ttatatt ctgtacattaaagattgttttttccaggctgtttcataggta 1274
ctaggatattaaactgttattaacctattttccatgatgtcaactgcttaa 1325
gttttta tgcagaaataaattatatattta 1355
```

V5

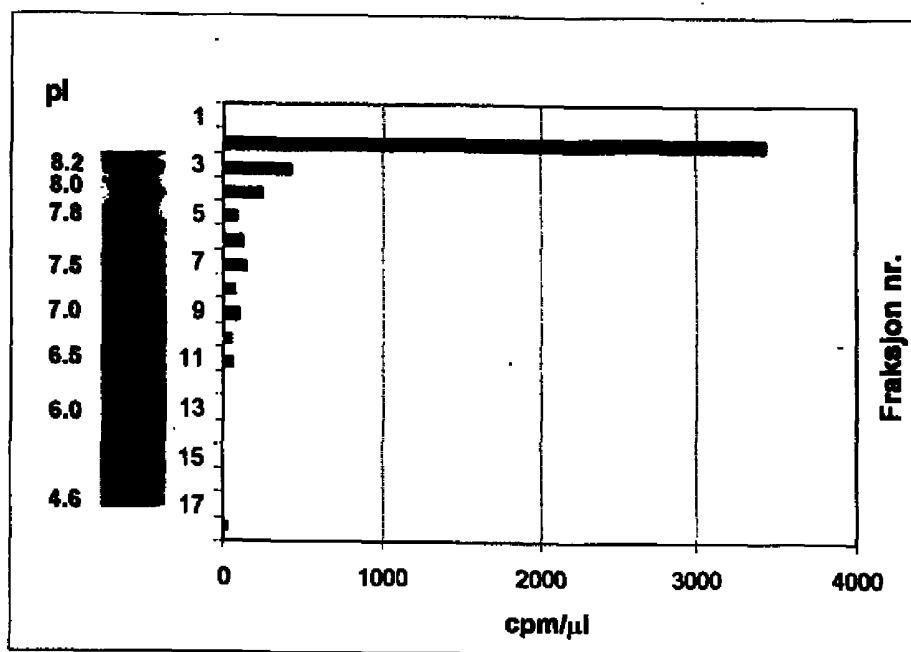


Fig. 1

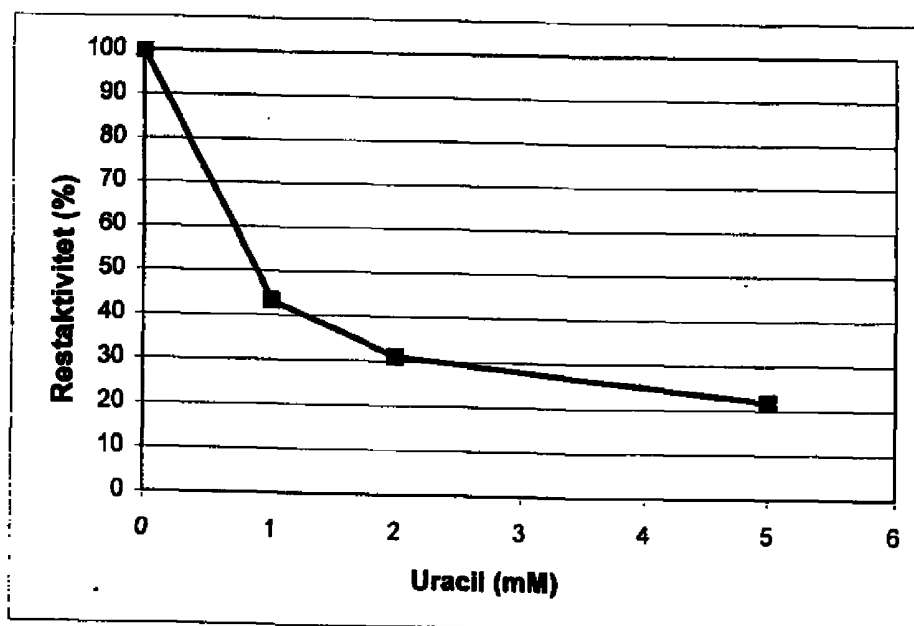


Fig. 2

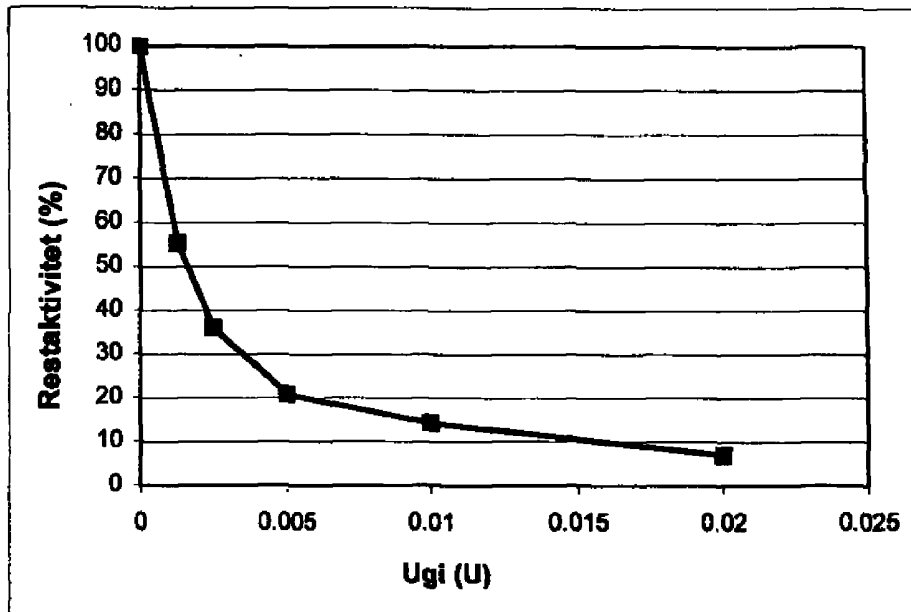


Fig. 3

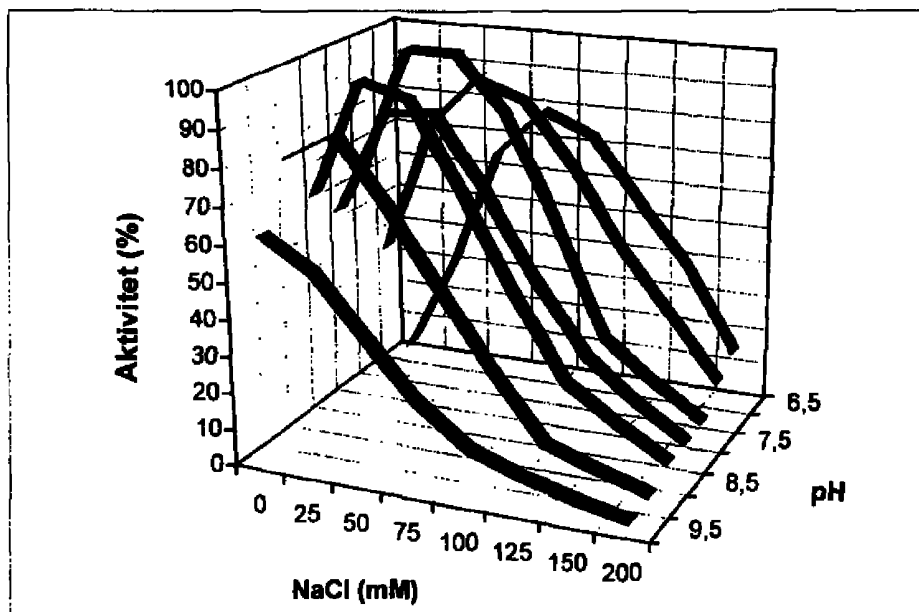


Fig. 4

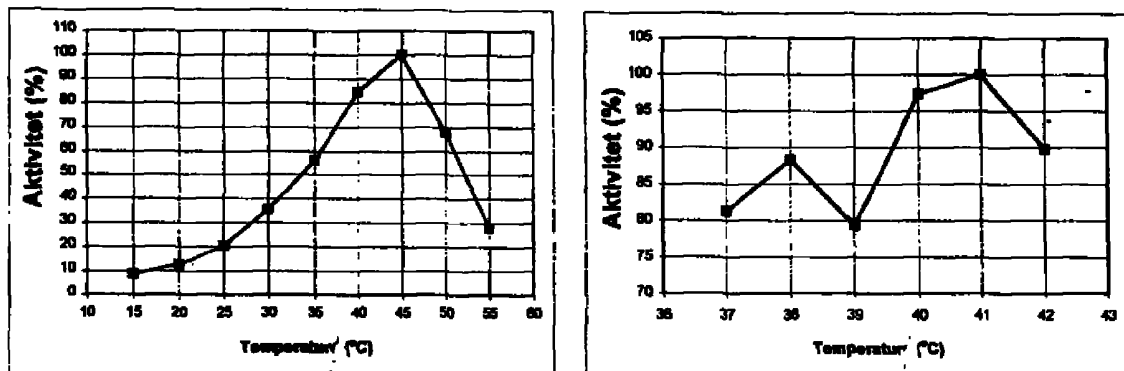


Fig. 5

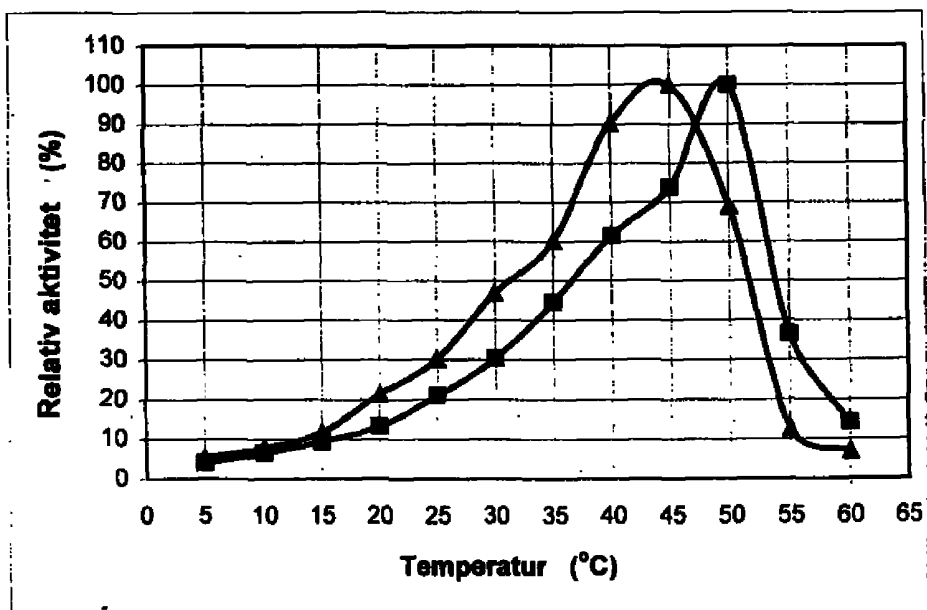


Fig. 6

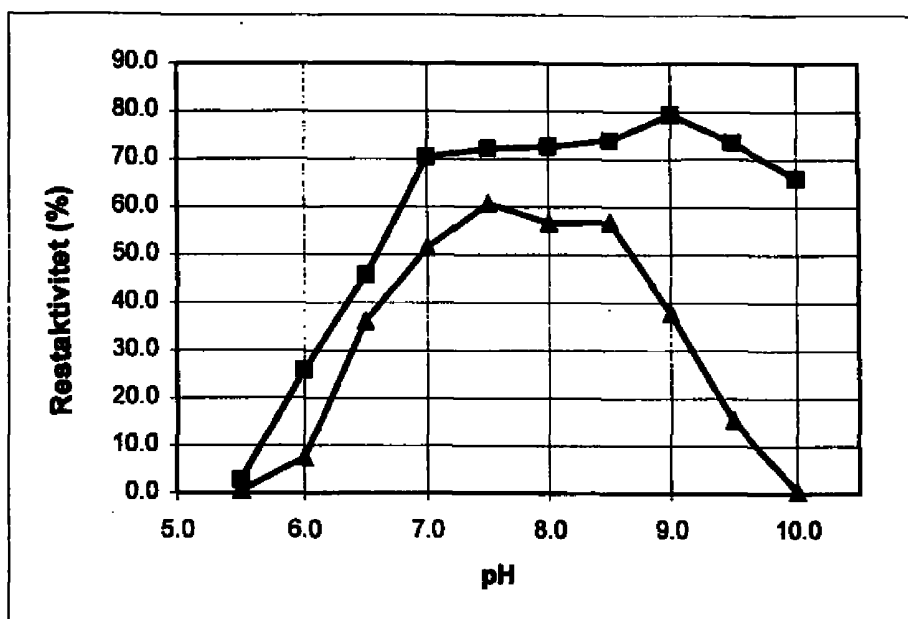


Fig. 7

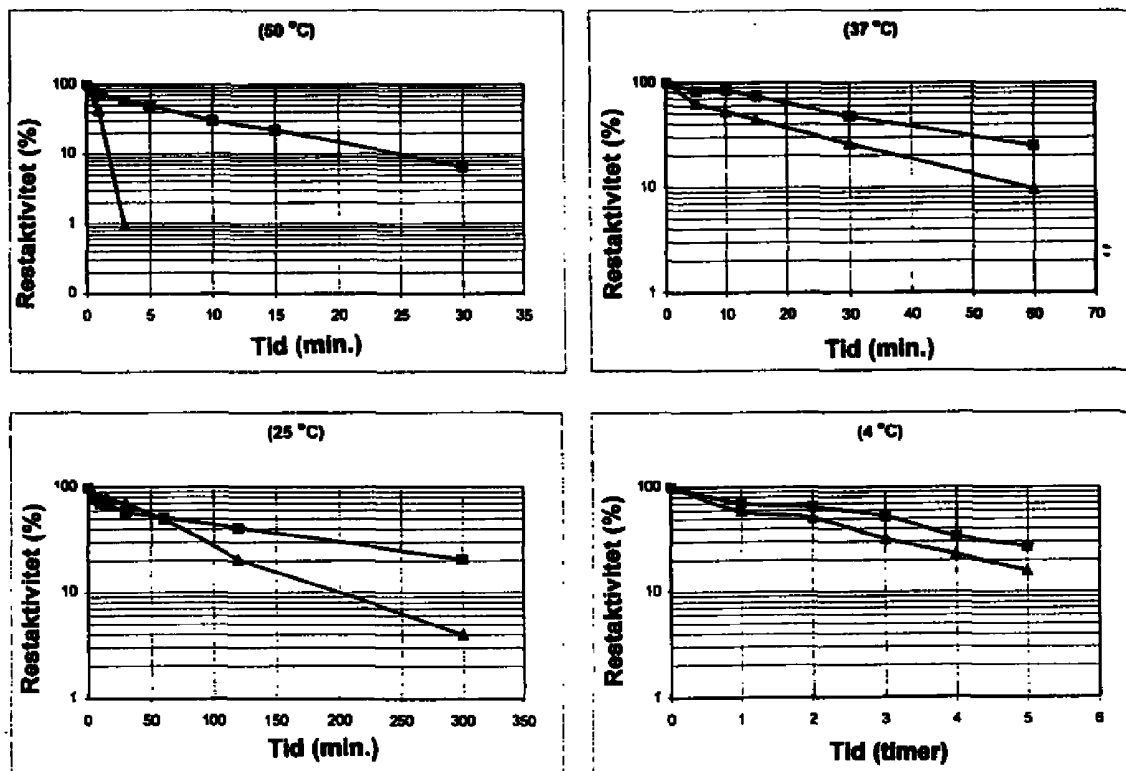


Fig. 8

5/5

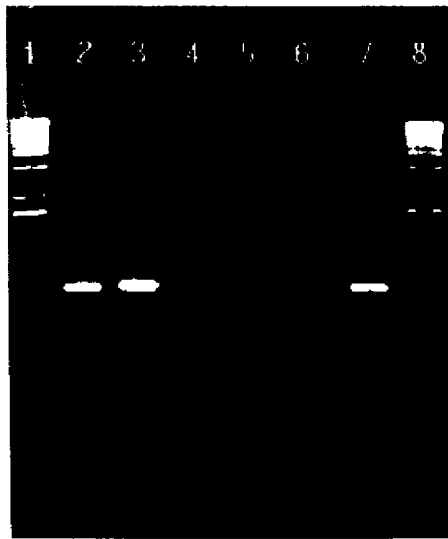


Fig. 9