



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 12 825 T2** 2007.01.11

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 383 897 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/52** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 12 825.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP02/04942**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 740 565.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/090551**

(86) PCT-Anmeldetag: **03.05.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **14.11.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.01.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **28.06.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.01.2007**

(30) Unionspriorität:

01201631	03.05.2001	EP
01204785	07.12.2001	EP

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(73) Patentinhaber:

**Vlaams Interuniversitair Instituut voor
Biotechnologie vzw., Zwijnaarde, BE**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

STEIDLER, Lothar, Cork, IE

(54) Bezeichnung: **SELBSTERHALTENDER LACTOCOCCUS STAMM**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft einen rekombinanten Lactococcus Stamm mit ökologisch begrenztem Wachstum und ökologisch begrenzter Lebensfähigkeit. Insbesondere betrifft sie einen rekombinanten Lactococcus, der nur in einem Medium überleben kann, in dem genau abgegrenzte Mediumsverbindungen vorhanden sind. Eine bevorzugte Ausführungsform ist ein Lactococcus, der nur in einem Wirtsorganismus überleben kann, in dem die Mediumsverbindungen vorhanden sind, aber bei fehlenden Mediumsverbindungen nicht außerhalb des Wirtsorganismus überleben kann. Darüber hinaus kann der Lactococcus mit prophylaktischen und/oder therapeutischen Molekülen transformiert werden und kann als solches zur Behandlung von Erkrankungen, wie beispielsweise entzündlichen Darmerkrankungen, verwendet werden

Hintergrund der Erfindung

[0002] Milchsäurebakterien werden seit langem bei einer großen Vielfalt von industriellen Fermentierungsverfahren verwendet. Sie werden generell als sicher angesehen, wodurch sie potentiell nützliche Organismen zur Herstellung von kommerziell wichtigen Proteinen werden. Tatsächlich werden mehrere heterologe Proteine, wie beispielsweise Interleukin-2, erfolgreich in Lactococcus spp produziert (Steidler u.a., 1995). Es ist allerdings nicht erwünscht, dass solche genetisch modifizierten Mikroorganismen in der Umwelt überleben und sich ausbreiten. Um ein unbeabsichtigtes Freisetzen von genetisch modifizierten Mikroorganismen zu vermeiden, werden bestimmte Richtlinien für eine sichere Handhabung und technische Maßgaben für eine physische Einschließung angewendet. Obwohl dies bei industriellen Fermentationen nützlich sein kann, wird die physische Einschließung im Allgemeinen nicht als ausreichend angesehen und es werden zusätzliche biologische Einschließungsmaßnahmen getroffen, um die Möglichkeit eines Überlebens des genetisch modifizierten Mikroorganismus in der Umwelt zu reduzieren. Die biologische Einschließung ist in den Fällen äußerst wichtig, in denen die physische Einschließung schwierig oder sogar nicht anwendbar ist. Dies ist unter anderem bei Anwendungen der Fall, bei denen genetisch modifizierte Mikroorganismen als lebende Impfstoffe oder als Träger für die Verabreichung von therapeutischen Verbindungen verwendet werden. Solche Anwendungen sind zum Beispiel in der WO 97/14806 beschrieben worden, der die Abgabe von biologisch wirksamen Peptiden, wie beispielsweise Cytokinen, an eine Person durch rekombinante, nicht invasive oder nicht pathogene Bakterien offenbart. Die WO 96/11277 beschreibt die Abgabe von therapeutischen Verbindungen an ein Tier – einschließlich den Menschen – durch Verabreichung eines rekombinanten Bakteriums, das das therapeutische Protein kodiert. Steidler u.a. (2000) beschreiben die Behandlung einer Kolitis durch Verabreichung eines rekombinanten Lactococcus lactis unter Sekretion von Interleukin-10. Eine solche Abgabe kann tatsächlich zur Behandlung einer Erkrankung bei einem betroffenen Menschen oder Tier äußerst nützlich sein, aber das rekombinante Bakterium kann als schädlicher und pathogener Mikroorganismus auftreten, wenn er in eine nicht betroffene Person gelangt, und daher wird eine wirksame biologische Einschließung, die eine solche unbeabsichtigte Verbreitung des Mikroorganismus vermeidet, benötigt.

[0003] Biologische Einschließungssysteme für Wirtsorganismen können auf der Grundlage einer strikten Anforderung des Wirts für einen bestimmten Wachstumsfaktor oder einen Nährstoff, der nicht vorhanden ist oder in geringen Konzentrationen in der äußeren Umgebung vorhanden ist, passiv sein oder auf der Grundlage von so genannten suizidalen genetischen Elementen im Wirt aktiv sein, wobei der Wirt in der äußeren Umgebung durch eine Zelltötungsfunktion getötet wird, die durch ein Gen kodiert wird, das unter der Kontrolle eines nur unter bestimmten Umweltbedingungen exprimierten Promotors steht.

[0004] Passive biologische Einschließungssysteme sind in Mikroorganismen, wie beispielsweise Escherichia coli oder Saccharomyces cerevisiae, weithin bekannt. Solche E. coli Stämme sind zum Beispiel in der US 4190495 offenbart. Die WO 95/1061 offenbart Milchsäurebakterien-Suppressormutanten und ihre Verwendung als Einschließungsmittel in Milchsäurebakterien, aber in diesem Fall erfolgt die Einschließung auf der Plasmidebene und nicht auf der Ebene des Wirtsstamms und sie stabilisiert das Plasmid im Wirtsstamm, sieht aber keine Einschließung für den genetisch modifizierten Wirtsstamm selbst vor.

[0005] Es sind aktive suizidale Systeme von mehreren Autoren beschrieben worden. Ein solches System besteht aus zwei Elementen: einem letalen Gen und einer Kontrollsequenz, die unter nicht permissiven Bedingungen auf die Expression des letalen Gens wechselt. Die WO 95/10614 offenbart die Verwendung einer zytoplasmatisch aktiven, verkürzten und/oder mutierten Staphylococcus aureus Nuklease als letales Gen. Die WO 96/40947 offenbart ein rekombinantes bakterielles System mit ökologisch begrenzter Lebensfähigkeit entweder auf der Grundlage der Expression eines essentiellen Gens, das exprimiert wird, wenn sich die Zelle in

der permissiven Umgebung befindet, und nicht exprimiert wird oder zeitweise exprimiert wird, wenn sich die Zelle in der nicht permissiven Umgebung befindet, und/oder eines letalen Gens, wobei die Expression des Gens für die Zelle letal ist und das letale Gen exprimiert wird, wenn sich die Zelle in der nicht permissiven Umgebung befindet, nicht aber, wenn sich die Zelle in der permissiven Umgebung befindet. Die WO 99/58652 beschreibt ein biologisches Einschließungssystem auf der Grundlage des reIE Cytotoxins. Allerdings sind die meisten Systeme für *Escherichia coli* (Tedkin u.a., 1995; Knudsen u.a., 1995; Schweder u.a., 1995) oder für *Pseudomonas* (Kaplan u.a., 1999; Molino u.a., 1998) ausgearbeitet worden. Obwohl mehrere der Einschließungssysteme theoretisch auf Milchsäurebakterien angewendet werden können, ist für *Lactococcus* kein bestimmtes biologisches Einschließungssystem beschrieben worden, das die Verwendung eines selbsterhaltenden und transformierten *Lactococcus* zur Abgabe von prophylaktischen und/oder therapeutischen Molekülen ermöglicht, um Krankheiten zu verhindern und/oder zu behandeln.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0006] [Fig. 1](#): Karte des MG1363 thyA Locus

[0007] [Fig. 2](#): Schematische Darstellung der unterschiedlichen Expressionsmodule, wie sie auf pOThy Plasmiden und genomischen Integranten von hIL-10 vorhanden sind. Die schwarzen Teile stellen die ursprüngliche genetische *L. lactis* MG1363 Information dar, die weißen Teile stellen die rekombinante genetische Information dar.

[0008] [Fig. 3](#): Die PCR-Identifikation von Thy 11 (Thy 11 1.1 und Thy 11 7.1 stellen einzeln erhaltene, identische Klone dar). Die Standard-PCR-Reaktionen wurden mittels Aliquoten von gesättigten Kulturen der angegebenen Stämme als Quelle einer DNA-Matrize durchgeführt. Die Abbildung A zeigt ein Agarosegel der Produkte der angegebenen PCR-Reaktionen. Die Abbildung B zeigt die Positionen, bei denen die Primer in der thyA (1), stromaufwärtigen (2) oder stromabwärtigen (3) PCR anlagern. Verwendete Oligonukleotidprimer (1): ATgACTTACgCAGATCAAgtTTTT und TTAAATTgCTAAATCAAATTTCAATTg (2): TCTgATTgAgTACCTTgACC und gCAATCATAATTggTTTTATTg (3): CTTACATgACTATgAAAATCCg und cTTTTTTATTATTAgggAAAgCA.

[0009] [Fig. 4](#): PCR-Identifikation von Thy11, Thy12, Thy15 und Thy16. Standard-PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung von drei Tage alten Kolonien der angegebenen Stämme als Quelle der DNA-Matrize durchgeführt.

[0010] Die Abbildung A zeigt die Positionen, bei denen Primer sich in der stromaufwärtigen (1), stromabwärtigen (2) oder thyA (3) PCR anlagern. Verwendete Oligonukleotidprimer: (1) ATgACTTACgCAGATCAAgtTTTT und TTAAATTgCTAAATCAAATTTCAATTg (2): TCTgATTgAgTACCTTgACC und gCAATCATAATTggTTTTATTg (3): CTTACATgACTATgAAAATCCg und cTTTTTTATTATTAgggAAAgCA

[0011] Die Abbildung B zeigt ein Agarosegel der Produkte der angegebenen PCR-Reaktionen.

[0012] [Fig. 5](#): Southern Blot Analyse der angegebenen Stämme. Chromosomale DNA wurde extrahiert und mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut. Nach einer Agarosegelelektrophorese wurde die DNA auf eine Membran übertragen und der Chromosomenaufbau um den thyA Locus wurde durch Verwendung von DIG-markierten thyA oder hIL-10 DNA-Fragmenten gezeigt (Veranschaulichung A). Die Veranschaulichung B zeigt eine schematische Übersicht über den Aufbau des thyA Locus sowohl in MG1363 als auch Thy11.

[0013] [Fig. 6](#): Abbildung A zeigt eine schematische Übersicht über einen Teil des vorhergesagten Aufbaus des *L. lactis* Chromosoms am thyA Locus in MG1363, Thy11, Thy11, Thy15 und Thy 16. Die Zahlen geben Basenpaare an.

[0014] Abbildung B. Southern Blot Analyse der angegebenen Stämme. Chromosomale DNA wurde extrahiert und mit NdeI und SpeI Restriktionsenzymen verdaut. Nach einer Agarosegelelektrophorese wurde die DNA auf eine Membran übertragen und der Chromosomenaufbau um den thyA Locus wurde mittels DIG-markierten thyA- oder hIL-10 DNA-Fragmenten offenbart.

[0015] [Fig. 7](#): Herstellung von hIL-10. Die Abbildung A zeigt einen Western Blot, der mit einem anti-hIL-10 Antiserum von Kulturüberstand und zellassoziierten Proteinen der angegebenen Stämme realisiert wurde. Die Abbildung B zeigt die Mengenbestimmung (mittels ELISA) von im Kulturüberstand vorhandenem hIL-10.

[0016] Fig. 8: Herstellung von hIL-10. Die Abbildung A zeigt die Mengenbestimmung (mittels ELISA) von hIL-10, das im Kulturüberstand der angegebenen Stämme vorhanden war. Die Abbildung B zeigt einen Western Blot, der mit anti-hIL-10 Antiserum der Kulturüberstandsproteine der angegebenen Stämme realisiert wurde.

[0017] Fig. 9: Herstellung von hIL-10 durch die *L. lactis* Stämme LL108, die entweder pOThy11, pOThy12 oder pOThy16 tragen. Die Mengenbestimmung (durch ELISA) von im Kulturüberstand der angegebenen Stämme vorhandenem hIL-10. Die N-terminale Proteinsequenz des rekombinanten hIL-10 wurde durch Edman-Abbau bestimmt und war, wie gezeigt wurde, mit dem Aufbau identisch, wie er für das reife, rekombinante hIL-10 vorhergesagt wurde. Das Protein zeigt die volle biologische Wirksamkeit.

[0018] Fig. 10: Wachstumsrate der angegebenen Stämme in GM17, enthaltend 100 µg/ml (T100) 50 µg/ml (T50) 25 µg/ml (T25) oder kein (T0) extra Thymidin und möglicherweise mit 5 µg/ml Erythromycin (E) ergänzt. Gesättigte Übernachtskulturen (hergestellt in T50) wurden 1:100 in den angegebenen Kulturmedien verdünnt. Abbildung A zeigt die Kinetik des Aufbaus des Absorptionsvermögens. Die Abbildung B zeigt die Kinetik der Anzahl von koloniebildenden Einheiten (cfu).

[0019] Fig. 11: Wachstumsrate von MG1363 und Thy12 in thymidinfreiem Medium (TFM). TFM wurde durch Wachsenlassen von *L. lactis* Thy12 Bakterien in GM17, Entfernen der Bakterien durch anschließende Zentrifugation und Filtration auf einem Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm, Einstellen des pH-Werts auf 7,0 und Autoklavierung hergestellt.

[0020] MG1363 und Thy12 Bakterien wurden von einer Übernachtskultur in GM17 bzw. GM17 + 50 µg/ml Thymidin gesammelt und in M9 Puffer (6 g/l Na₂HPO₄, 3 g/l KH₂PO₄, 1 g/l NH₄Cl, 0,5 g/l NaCl in Wasser) gewaschen. Die Suspensionen von beiden wurden entweder in TFM oder mit 50 µg/ml Thymidin (T50) ergänzt TFM verdünnt. Die CFU-Zahlen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt: t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 20 Stunden.

[0021] Dies zeigt, dass die Lebensfähigkeit von Thy12 bei einem Fehlen von Thymidin stark eingeschränkt ist.

[0022] Fig. 12: Darm-Passage und Lebensfähigkeit: *L. lactis* MG1363 wurde mit dem Plasmid pLET2N transformiert, das einen Chloramphenicol (Cm) Resistenzmarker trägt. *L. lactis* Thy12 wurde mit dem Plasmid pT1NX transformiert, das einen Erythromycin (Em) Resistenzmarker trägt. Von beiden Stämmen wurden 10⁹ Bakterien erneut in BM9 (6 g/l Na₂HPO₄, 3 g/l KH₂PO₄, 1 g/l NH₄Cl, 0,5 g/l NaCl in 25 mM NaHCO₃ + 25 mM Na₂CO₃) suspendiert, gemischt und in drei Mäuse bei t = 0h inokuliert. Der Kot wurde in den Zeiträumen –1 bis 0, 0 bis 1, 1 bis 2, 2 bis 3, 3 bis 4, 4 bis 5, 5 bis 6, 6 bis 7, 7 bis 8, 8 bis 9, 9 bis 10 und 10 bis übernacht gesammelt. Alle Proben wurden in isotonischem Puffer erneut suspendiert und geeignete Verdünnungen wurden auf GM17 (M17 Medium, Difco, St. Louis, ergänzt mit 0,5 % Glucose) Platten geschichtet, die entweder Cm, Em oder Em + 50 µg/ml Thymidin enthielten. Koloniebildende Einheiten für die unterschiedlichen Platten sind in dem Schaubild dargestellt.

Beschreibung der Erfindung

[0023] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein geeignetes biologisches Einschließungssystem für *Lactococcus* zur Verfügung zu stellen.

[0024] Ein erster Aspekt der Erfindung ist die Verwendung eines Stamms von *Lactococcus* sp., der ein Thymidylat-Synthase-Gen umfasst, das durch Gendisruption inaktiviert ist. *Lactococcus* sp. ist bevorzugt *Lactococcus lactis*. Eine besondere Ausführungsform ist ein *Lactococcus* sp. Stamm, vorzugsweise *Lactococcus lactis*, besonders bevorzugt ein *Lactococcus lactis* MG1363 Derivat, wobei das Thymidylatsynthasegen disruptiert wird und durch eine Interleukin-10 Expressionseinheit ersetzt wird. Die Interleukin-10 Expressionseinheit ist vorzugsweise eine humane Interleukin-10 Expressionseinheit oder ein Gen, das für humanes Interleukin-10 kodiert, aber es ist nicht darauf beschränkt.

[0025] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung eines Stammes gemäß der Erfindung als Wirtstamm zur Transformation, wobei das transformierende Plasmid kein Thymidylat-Synthase-Gen umfasst, das durch Gendisruption inaktiviert wurde. Ein noch weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen transformierten Stamm von *Lactococcus* sp. gemäß der Erfindung, der ein Plasmid umfasst, das ein durch Gendisruption inaktiviertes Thymidylat-Synthase-Gen aufweist. Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen transformierten Stamm von *Lactococcus* sp., der ein Gen oder eine Expressionseinheit umfasst, die für ein prophylak-

tisches und/oder therapeutisches Molekül, wie beispielsweise Interleukin-10, kodiert. Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung eines transformierten Stamms von *Lactococcus* sp., um prophylaktische und/oder therapeutische Moleküle abzugeben, und als solchen um Krankheiten zu behandeln. Verfahren zur Abgabe der Moleküle und Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen, wie beispielsweise entzündliche Darmerkrankungen, werden ausführlich in der WO 97/14806 und der WO 00/23471 von Steidler u.a. und in Steidler u.a. (Science 200, 289:1352) erläutert.

[0026] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine medizinische Herstellung, die einen transformierten Stamm von *Lactococcus* sp. gemäß der Erfindung umfasst.

[0027] Das *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Thymidylat-Synthase-Gen (*thyA*) wurde von Ross u.a. (1990a) kloniert; seine Sequenz ist in SED ID N° 3 und SED ID N° 5 beinhaltet. Die EP 0406003 offenbart einen Vektor, dem eine antibiotische Resistenz fehlt und der ein Thymidylat-Synthase-Gen als Selektionsmarker trägt; derselbe Vektor ist von Ross u.a. (1990b) beschrieben worden. Allerdings konnte dieser Vektor aufgrund des Fehlens einer geeigneten *thyA*-Mutante, die nie beschrieben wurde, nicht in einem *Lactococcus lactis* Stamm verwendet werden. Die vorliegende Erfindung offenbart, wie eine solche Mutante durch Genruption mittels einer homologen Rekombination in *Lactococcus* konstruiert werden kann. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das *thyA* Gen durch eine funktionelle humane Interleukin-1 Expressionskassette disruptiert. Allerdings ist es klar, dass für die Genruption jedes Konstrukt verwendet werden kann, solange dies zu einer Inaktivierung des *thyA* Gens oder einer inaktiven Thymidylat-Synthase führt. Als nicht einschränkendes Beispiel kann die homologe Rekombination zu einer Deletion des Gens in einer oder mehr Aminosäuresubstitutionen führen, die eine inaktive Form der Thymidylat-Synthase ergibt, oder auch zu einer Rasterverschiebungsmutation, was zu einer verkürzten Proteinform führt.

[0028] Eine solche *Lactococcus* sp. *thyA* Mutante ist als Wirtsstamm für eine Transformation in den Situationen sehr nützlich, in denen eine stärkere Einschließung als die rein physische Einschließung notwendig ist. Tatsächlich können *thyA* Mutanten nicht in einer Umgebung ohne oder nur mit einer beschränkten Konzentration an Thymidin und/oder Thymin überleben. Wenn ein solcher Stamm mit einem Plasmid transformiert wird, das kein intaktes *thyA* Gen umfasst und die Mutation nicht komplementieren kann, wird der transformierte Stamm in einer Thymidin/Thymin-armen Umgebung suizidal. Ein solcher Stamm kann in einem Fermenter verwendet werden, und zwar als zusätzlicher Schutz für die physische Einschließung. Darüber hinaus offenbart die vorliegende Erfindung, dass ein solcher Stamm in den Fällen besonders nützlich ist, in denen der Stamm als Abgabevehikel in einen Tierkörper verwendet wird. In der Tat überlebt ein solcher transformierter Stamm, wenn er einem Tier – einschließlich einem Menschen – zum Beispiel oral verabreicht wird, im Darm, vorausgesetzt eine ausreichend hohe Konzentration an Thymidin/Thymin ist vorhanden, und erzeugt homologe und/oder heterologe Proteine, wie beispielsweise humanes Interleukin-10, das für das Tier nützlich sein kann. Die vorliegende Erfindung zeigt weiter, dass die transformierten Stämme überraschenderweise den Darm mit derselben Geschwindigkeit wie die Kontrollstämme passieren, und zeigt, dass ihr Verlust an Lebensfähigkeit tatsächlich nicht von der der Kontrollstämme unterschiedlich ist. Allerdings ist der Stamm, sobald er in die Umgebung abgegeben wird, z.B. im Kot, nicht in der Lage, weiterzuleben.

[0029] Das transformierende Plasmid kann jedes Plasmid sein, solange es nicht die *thyA* Mutation komplementieren kann. Es kann sich hierbei um ein selbstreplizierendes Plasmid handeln, das vorzugsweise ein oder mehr interessante Gene und ein oder mehr Resistenzmarker trägt, oder es kann ein integratives Plasmid sein. Im letzteren Fall kann das integrative Plasmid selbst dazu verwendet werden, die Mutation zu erzeugen, indem die Integration an der *thyA* Stelle bewirkt wird, wodurch das *thyA* Gen inaktiviert wird. Vorzugsweise wird das aktive *thyA* Gene durch doppelte homologe Rekombination mittels einer Kassette ersetzt, die das interessante Gen oder die interessanten Gene umfasst, welche durch Zielsequenzen flankiert sind, die die Insertion auf die *thyA* Zielstelle richten. Es ist von äußerster Wichtigkeit, dass diese Sequenzen ausreichend lang und ausreichend homolog sind, um eine Integration der Sequenz in die Zielstelle zu erreichen. Vorzugsweise bestehen diese Zielsequenzen aus mindestens 100 benachbarten Nukleotiden an einer Seite des interessanten Gens und mindestens 100 benachbarten Nukleotiden von SEQ ID N° 2 an der anderen Seite; besonders bevorzugt bestehen die Zielsequenzen aus mindestens 500 benachbarten Nukleotiden von SEQ ID N° 1 an einer Seite des interessanten Gens und mindestens 500 benachbarten Nukleotiden von SEQ ID N° 2 an der anderen Seite; am meisten bevorzugt bestehen die Zielsequenzen aus SEQ ID N° 1 an einer Seite des interessanten Gens und aus SEQ ID N° 2 an der anderen Seite, oder die Zielsequenzen bestehen aus mindestens 100 Nukleotiden, die zu mindestens 80 % identisch, vorzugsweise zu 90 % mit einer Region von SEQ ID N° 1 an einer Seite des interessanten Gens identisch sind, und aus mindestens 100 Nukleotiden, die zu mindestens 80 % identisch, vorzugsweise 90 % mit einer Region von SEQ ID N° 2 an der anderen Seite des interessanten Gens identisch sind, vorzugsweise bestehen die Zielsequenzen aus mindestens 500 Nukleotiden, die zu mindestens

80 % identisch, vorzugsweise 90 % mit einer Region von SEQ ID N° 1 an einer Seite des interessanten Gens identisch sind, und aus mindestens 500 Nukleotiden, die zu mindestens 80 % identisch, vorzugsweise 90 % mit einer Region von SEQ ID N° 2 an der anderen Seite des interessanten Gens identisch sind, am meisten bevorzugt bestehen die Zielsequenzen aus mindestens 1000 Nukleotiden, die zu mindestens 80 % identisch, vorzugsweise 90 % mit einer Region von SEQ ID N° 1 an einer Seite des interessanten Gens identisch sind, und aus mindestens 1000 Nukleotiden, die zu mindestens 80 % identisch, vorzugsweise zu 90 % mit einer Region von SEQ ID N° 2 an der anderen Seite des interessanten Gens identisch sind. Die prozentuale Identität wird mit BLAST gemäß Altschul u.a. (1997) gemessen. Ein bevorzugtes Beispiel einer Sequenz, die zu SEQ ID N° 1 homolog ist, wird in SEQ ID N° 7 gegeben. Für den Zweck der Erfindung sind SEQ ID N° 1 und SEQ ID N° 7 austauschbar.

[0030] Transformationsverfahren von *Lactococcus* sind dem Fachmann bekannt und umfassen die Protoplasttransformation und Elektroporation, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0031] Ein transformierter *Lactococcus* sp. Stamm gemäß der Erfindung ist zur Abgabe von prophylaktischen und/oder therapeutischen Molekülen nützlich und kann in einer pharmazeutischen Zusammensetzung verwendet werden. Die Abgabe von solchen Molekülen ist als nicht einschränkendes Beispiel in der WO 97/14806 und in der WO 98/31786 offenbart worden. Die prophylaktischen und/oder therapeutischen Moleküle umfassen Polypeptide, wie beispielsweise Insulin, Wachstumshormon, Prolactin, Calcitonin, Zytokine der Gruppe 1, Zytokine der Gruppe 2 und Zytokine der Gruppe 3, und Polysaccharide, wie beispielsweise Polysaccharidantigene von pathogenen Bakterien, sind aber nicht darauf beschränkt. Eine bevorzugte Ausführungsform ist die Verwendung eines *Lactococcus* sp. Stamms gemäß der Erfindung zur Abgabe von humanem Interleukin-10. Dieser Stamm kann zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung der Crohn-Krankheit wie oben angegeben verwendet werden.

Beispiele

[0032] Von *L. lactis* MG1363 (Gasson, 1983) haben wir die Regionen auskloniert, die die Sequenz gemäß Roos u.a. (1990a) flankieren.

[0033] Die Kenntnis von diesen Sequenzen ist von kritischer Bedeutung für die Gentechnik jedes *Lactococcus*-Stamms, wie unten beschrieben, da die Strategie eine doppelte homologe Rekombination in den Gebieten 1000 bp am 5'-Ende (SEQ ID N° 1) und 1000 bp am 3'-Ende (SEQ ID N° 2) von *thyA*, dem „*thyA* Ziel“, anwendet. Diese Sequenzen sind bis jetzt nicht aus einer öffentlichen Quelle erhältlich. Wir haben diese flankierenden DNA-Fragmente kloniert und ihre Sequenz identifiziert. Die Sequenz des gesamten Locus ist in der SEQ ID N° 3 gezeigt; eine Mutantenversion dieser Sequenz ist in SEQ ID N° 5 gezeigt. Sowohl die 5'- als auch die 3'-Sequenz unterscheiden sich von der Genbank-Sequenz AE 006385, die die *L. lactis* IL1403 Sequenz beschreibt (Bolotin, in der Presse) oder AF 336368, die die *L. lactis* subsp. *Lactis* CHCC373 Sequenz beschreibt. Aus der Literatur ist ersichtlich, dass die homologe Rekombination durch Verwendung der veröffentlichten Sequenzen benachbart zu *thyA* (Ross u.a., 1990a) (86 bp am 5'-Ende und 31 bp am 3'-Ende) aufgrund der Kürze der Sequenzen praktisch unmöglich ist. Tatsächlich beschreiben Biswas u.a. (1993) eine logarithmisch abnehmende Korrelation zwischen der Länge der homologen Sequenzen und der Häufigkeit der Integration. Die Sequenzen von *L. lactis* Thy11, Thy12, Thy15 und Thy16 am *thyA* Locus, wie in der vorliegenden Erfindung bestimmt, werden durch SEQ ID N° 19, 20, 21 bzw. 22 angegeben.

[0034] Der *thyA* Austausch wird durch Herstellung von geeigneten Austauschen in einer Plasmid getragenen Version des *thyA* Ziels durchgeführt, wie nachfolgend beschrieben. Das Trägerplasmid ist von pORI19 abgeleitet (Law u.a., 1995), einem replikationsdefekten Plasmid, das die Erythromycinresistenz nur einem bestimmten Stamm überträgt, wenn eine erste homologe Rekombination entweder an 5' 1000 bp oder am 3' 1000 pg des *thyA* Ziels erfolgt. Eine zweite homologe Rekombination an 3' 1000 bp oder an 5' 1000 bp des *thyA*-Ziels ergibt den gewünschten Stamm.

[0035] Das *thyA*-Gen wird durch ein synthetisches Gen ersetzt, das ein Protein kodiert, das den *L. lactis* Usp45 Sekretionsleader (van Asseldonk u.a., 1990) an ein Protein mit identischer Aminosäuresequenz fusioniert hat, und zwar als: (a) den reifen Teil von humanem Interleukin 10 (hIL-10) oder (b) den reifen Teil von hIL-10, bei dem Prolin in der Position 2 durch Alanin ersetzt wurde, oder (c) den reifen Teil von hIL-10, bei dem die ersten zwei Aminosäuren deletiert wurden; (a), (b) und (c) werden hIL-10 Analoge genannt, die Fusionsprodukte werden als Usp45-hIL-10 bezeichnet.

[0036] Das *thyA* Gen wird durch eine Expressionseinheit ersetzt, umfassend den *Lactococcus*-P1 Promotor

(Waterfield u.a., 1995), die E. coli Bakteriophagen T7 Expressionssignale: vermeintliche RNA-Stabilisierungssequenz und modifizierte Gen 10 ribosomale Bindungsstelle (Wells und Schofield, 1996):

[0037] Am 5'-Ende wird die Insertion derart durchgeführt, dass das ATG von thyA an die P1-T7Usp45-hIL-10 Expressionseinheit fusioniert wird.

```
5' agataggaaaatttcatgacttacgcagatcaagttttt...thyA Wildtyp
                        gattaagtcaccttacctctt...P1-T7-usp45-hIL10
5' agataggaaaatttcatggattaagtcaccttacctctt...thyA-, P1-T7-usp45-
hIL10
```

[0038] Alternativ wird am 5'-Ende die Insertion derart durchgeführt, dass das thyA ATG nicht eingeschlossen ist:

```
5' agataggaaaatttcacttacgcagatcaagttttt...thyA Wildtyp
                        gattaagtcaccttacctctt...P1-T7-usp45-hIL10
5' agataggaaaatttcgattaagtcaccttacctctt...thyA-, P1-T7-usp45-hIL10
```

[0039] Alternativ wird am 5'-Ende die Insertion derart durchgeführt, dass der thyA Promoter [Ross, 1990 a] nicht eingeschlossen ist:

```
5' tctgagagggttatTTTgggaaatactattgaaccatcgaggtgtgtggataatgaaggg
aattaaaaagataggaaaatttcatg...thyA Wildtyp
```

```
                        gattaagtcaccttacctctt...P1-T7-
usp45-hIL10
5' tctgagagggttatTTTgggaaatactagattaagtcaccttacctctt...thyA-, P1-
T7-usp45-hIL10
```

[0040] Am 3'-Ende wurde eine ACTAGT Spel Restriktionsstelle direkt benachbart zum TAA Stoppkodon der usp45-hIL-10 Sequenz konstruiert. Diese wurde in eine

[0041] TCTAGA XbaI Restriktionsstelle ligiert, die direkt im Anschluss an das thyA Stoppkodon synthetisiert wurde.

```
aaaatccgtaacttaactagt3'...usp45-hIL10
gatttagcaatttaaattaaattaatctataagtt3'...thyA- Wildtyp
      tctagaattaatctataagttactga3'...synthetisiertes thyA Ziel
aaaatccgtaacttaactagaattaatctataagttactga3'...thyA-, usp45-hIL10
```

[0042] Diese Konstrukte sind in der [Fig. 2](#) gezeigt. Die Sequenzen von pOThy11, pOThy12, pOThy15 und pOThy16 sind durch SEQ ID N° 23, 24, 25 bzw. 26 gegeben.

[0043] Die sich ergebenden Stämme sind thyA-defizient, eine Mutante, die noch nicht für L. lactis beschrieben wurde. Sie hängt streng von der Zugabe von Thymin oder Thymidin für das Wachstum ab.

[0044] Die Deletionskarte sowie die PCR-Analyse aller Isolate/Mutanten der vorliegenden Erfindung sind in den [Fig. 3](#) und [Fig. 4](#) gezeigt. Das Vorhandensein der Thymidylat-Synthase und des Interleukin-10 Gens im Wildtyp-Stamm und in den unabhängigen Isolat/Mutanten wurde mittels Southern Analyse analysiert, wie in den [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) gezeigt. Die Region um das insertierte hIL-10 Gen wurde mittels PCR isoliert und die DNA-Sequenz wurde verifiziert. Der Aufbau ist mit der vorhergesagten Sequenz identisch.

[0045] Die humane Interleukin-10 Produktion in die Mutanten wurde mittels Western Blot Analyse geprüft und mit dem parentalen Stamm, der mit pTREX1 als negative Kontrolle transformiert war, und dem parentalen Stamm, der mit dem IL 10 erzeugendens Plasmid pT1HIL10apxa als positive Kontrolle transformiert war, verglichen ([Fig. 7A](#)). Die Konzentration im Kulturüberstand wurde mittels ELISA quantitativ bestimmt. Wie in der

Fig. 7B gezeigt ist, erzeugen beide Isolate der Mutante eine vergleichbare, signifikante Menge an hIL-10, auch wenn viel weniger als der Stamm, der mit dem nicht integrativen Plasmid pT1HIL10apxa transformiert ist. Die **Fig. 8** (Veranschaulichung A und B) zeigen weiter, dass alle Mutanten eine signifikante Menge an h-IL 10 erzeugen.

[0046] Die **Fig. 9** zeigt die Herstellung von hIL-10 durch die *L. lactis* Stämme LL108, die entweder pOThy11, pOThy12 oder pOThy16 tragen. Die Menge von hIL-10 wird (mittels ELISA) bestimmt, das im Kulturüberstand der angegebenen Stämme vorhanden ist. Die N-terminale Proteinsequenz des rekombinanten hIL-10 wurde durch Edman-Abbau bestimmt und war, wie sich zeigte, identisch mit dem Aufbau, wie er für das reife, rekombinante hIL-10 vorhergesagt war. Das Protein zeigte die volle biologische Wirksamkeit. LL108 ist ein *L. lactis* Stamm, der eine genomische Integration des repA Gens trägt, das für die Replikation von pORI19 abgeleiteten Plasmiden, wie beispielsweise pOThy11, pOThy12, pOThy15 oder pOThy16 erforderlich ist. Dieser Stamm wurde freundlicherweise von Dr. Jan Kok von der Universität Groningen zur Verfügung gestellt. Die Plasmide pOThy11, pOThy12, pOThy15 und pOThy16 tragen das synthetische humane IL-10 Gen in unterschiedlichen Promotorkonfigurationen (siehe **Fig. 2**), flankiert von ungefähr 1 kB genomischer DNA, die vom thyA Locus stammt, und zwar stromaufwärts und stromabwärts von thyA. Diese Plasmide wurden zur Konstruktion der genomischen Integration verwendet, wie beschrieben.

[0047] Die Wirkung der Thymidilatsynthesedeletion auf das Wachstum in Medien mit weniger Thymidin und in mit Thymidin ergänzten Medien wurde getestet; die Ergebnisse sind in den **Fig. 10** und **Fig. 11** zusammengefasst. Das Fehlen von Thymidin im Medium schränkt das Wachstum der Mutante stark ein und führt sogar nach vier Stunden Kultivierung zu einer Abnahme der koloniebildenden Einheiten. Die Zugabe von Thymidin zum Medium führt im Vergleich zum Wildtyp-Stamm zu einer identischen Wachstumskurve und Menge von koloniebildenden Einheiten, was zeigt, dass die Mutante das Wachstum oder die Lebensfähigkeit in einem mit Thymidin ergänzten Medium nicht beeinflusst. Die **Fig. 11** zeigt klar, dass die Thy12 Lebensfähigkeit bei einem Fehlen von Thymidin stark beeinträchtigt ist.

[0048] Die **Fig. 12** zeigt schließlich, dass *L. lactis* Thy12 den Darm von Mäusen mit der gleichen Geschwindigkeit wie MG1363 passiert. Ein Verlust der Lebensfähigkeit scheint zwischen Thy12 und MG1363 nicht unterschiedlich zu sein. Thy12 scheint von Thymidin im Hinblick auf das Wachstum vollständig abzuhängen, was zeigt, dass keine Thy12 Bakterien ein fremdes thyA Gen aufgenommen hatten.

Literatur

- Altschul, S. F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S.D, et al. (1993) High-efficiency gene inactivation and replacement system for grampositive bacteria. *J. Bacteriol.* 175, 3628–3635.
- Gasson, M. J. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154, 1–9.
- Kaplan, D.L., Mello, C., Sano, T., Cantor, C. and Smith, C. (1999). Streptavidin-based containment system for genetically engineered microorganisms. *Biomol. Eng.* 31, 135–140.
- Knudsen, S., Saadbye, P., Hansen, L.H., Collier, A., Jacobsen, B.L., Schlundt J. And Karistrom, O.H. (1995). Development and testing of improved suicide functions for biological containment of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 985–991.
- Law, J., Buist, G., Haandrikman, A. et al. (1995). A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J. Bacteriol.* 177, 7011–7018.
- Molina, L., Ramos, C., Ronchel, M.C., Molin, S. and Ramos, J.L (1998). Construction of an efficient biologically contained *Pseudomonas putida* strain and its survival in outdoor assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2072–2078.
- Ross, P., O’Gara, F. and Condon, S. (1990a). Cloning and characterization of the thymidylate synthase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2156–2163.
- Ross, P., O’Gara, F. and Condon, S. (1990b). Thymidylate synthase gene from *Lactococcus lactis* as a genetic marker: an alternative to antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2164–2169.
- Schweder, T., Hofmann, K. And Hecker, M. (1995). *Escherichia coli* K12 relA strains as safe hosts for expression of recombinant DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 718–723.
- Steidler, L., Hans, W., Schotte, L., Neirynck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fier, W. and Remaut, F. (2000). Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting Interleukin-10. *Science* 289, 1352–1355.
- Steidler, L. Wells, J.M., Raeymaekers, A., Vandekerckhove, J., Fiers, W. And Remaut, E. (1995). Secretion

of biologically active murine Interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1627–1629.

– Tedin, K. Witte, A. Reisinger, G., Lubitz, W. and Basi, U. (1995). Evaluation of the *E. coli* ribosomal *rmB* P1 promoter and phage derived lysis genes for the use in biological containment system: a concept study. *J. Biotechnol.* 39, 137– 148.

– van Asseldonk, M., Rutten, G., Oteman, M. et al. (1990). Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *Gene* 95, 155–160.

– Waterfield, N.R., Le Page, R.W., Wilson, P.W. et al. (1995) The isolation of lactococcal promoters and their use in investigating bacterial luciferase synthesis in *Lactococcus lactis*. *Gene* 165, 9–15.

– Wells, J.M. and Schofield, K.M. (1996) Cloning and expression vectors for *Lactococci*. *Nato ASI series H* 98, 37–62.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> VLAAMS INTERUNIVERSITAIR INSTITUUT VOOR BIOTECHNOLOGIE VZW

<120> Selbsterhaltender Lactococcus Stamm

<130> LS/ThyA/V085

<150> EP01201631.7

<151> 2001-05-03

<150> EP01204785.8

<151> 2001-12-07

<160> 26

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1000

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 1

```
tatatacaat tgagcaaaag aaatttagtt attaaattac cagctggagt tcctccaatg      60
gttgtagatt cactaagtcc agcaattatt tcaatgggga ttttctgttt gatgttcggg      120
attcgtgtgg gattctctta tacgccattc catgatattt tcaatttctc aacacaacta      180
attcaagcac cgttgactgg tgctgtggca aatccatggg ttcttatggg catctttacc      240
tttggttaatt tcttatgggt ctttgggtat caccctaatt taattggggg aatttttaaat      300
ccattgttat taacaatgtc atatgctaatt attgatgcct atgctgccgg aaaacctgta      360
ccatacttac aaatgatgat tgtgtttgct gtgggtgcga acgcatgggg cggaagtggg      420
aatacttatg ggttagttat ttcaatgttt acggcaaaat ctgaacgcta taaacaatta      480
ttaaaattag gtgcaattcc tagtattttc aatatcagtg aaccattact ttttgggtctt      540
ccaatgatgt taaatcctct tttctttatt cctttggttt tccaaccagc aatttttagga      600
actgtagcat tgggcttggc aaagatatta tatattacaa atctgaatcc aatgacggca      660
cttcttccct ggacgacacc agcacctgtg agaatggcca ttccaggtgg acttccattt      720
ttgattattt ttgcaatctg tttagtcttg aatgttctta ttactaccc attctttaag      780
gtggcgata ataaagcttt agaagaagaa aaagcagctg ttgaattaga gggttcagaa      840
actgcctgat ggatatTTTT tataaatctg gtttgaacaa attatattga catctctttt      900
tctatcctga taattctgag aggttatttt gggaaatact attgaaccat atcgaggtgt      960
gtggtataat gaagggaatt aaaaaagata ggaaaatttc      1000
```

<210> 2

<211> 1000

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 2

```

taaattaatc tataagttac tgacaaaact gtcagtaact ttttttgtgg gaaaaatgta      60
tttttatgac cgtaaagaat ctgtcagtag aagtctgaaa ttcgtttaaa aatcgactag      120

aataggcttt aacgacaaga tgttttaaaag agtacgctct aaatgtattt ttgtattttt      180
gtttgattac gaagttttaa ttttaattgac aaatgtttta aaatgagtat aataggactt      240
gtaaccgatt ttatttttat aaaggagaaa gaaagatgaa caaactttta cttggaacag      300
cctttatagg ggctagctta ctgattggtg ggggtgctca tgcagatcaa atgtttatcg      360
tttgataaat cataatactg gtgagcactc tatacaacta gtgggacacc aaaagaatgc      420
taatgtaagt gcgggttgga cttatgaagg tgtcggttgg atcgcaccaa caacaagttc      480
aagcccagtt tacctgtgtg acaatccaaa tgcattatta cacaaaaagc aagtatgaag      540
cccaaagttt agtaaataag ggttggaat gggataataa cggaaaggcg gtcttctatt      600
ctggagggtt tcaagccgta tatgtcgctt ataatcccaa tgcacaatct ggcgctcaca      660
attacacgga aagtagcttt gagcaaaata gcttattgaa tactggttgg aaatatgggg      720
cagtagcttg gtacgggatt ggagtaaaaa acgaaatggt aaacattgct caaattgtta      780
gtggaatatt ttctagtatt gttggaactt ggaaagatac ttctggaaat atgcttgaaa      840
ttaatgcaat gggaaatctt actttaatat ggaaaggggc aaagaatcaa acctttgaac      900
ttggcgcagg tcaacaatth aatggaactg cagatattgc cttaaaaaat ggagagattt      960
cccctggtag tccacttaac atttttgttg taccaacaga      1000

```

<210> 3
 <211> 7157
 <212> DNA
 <213> Lactococcus lactis

<220>
 <221> CDS
 <222> (4473)..(5312)
 <223>

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> 'n' may be any base

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> 'n' may be any base

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6612)..(6612)
 <223> 'n' may be any base

<220>

<221> misc_feature
 <222> (7099)..(7099)
 <223> 'n' may be any base

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7110)..(7110)
 <223> 'n' may be any base

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7117)..(7141)
 <223> 'n' may be any base

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7143)..(7147)
 <223> 'n' may be any base

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7149)..(7156)
 <223> 'n' may be any base

<400> 3

gnagnggttt tcccagtcg acgttgtaaa acgacggcca gtgaattcat taacagcctt	60
ttgagcagct agctcattat tttgaaataa atcataaatt tctttccac tatctgattt	120
atgattgcta gcataattgt tgtataatcg aacgagtcca ttttgaacag atccatatag	180
attgagtga ctataaaata catctatata atagttgagt ttgttcacaa tcatgagacc	240
aaattctcca gcatttcgtg tagaaccaag ataaagctgt ttatttagca aaatggcacc	300
tccgacacct gtacctaaag tcatgcaa ataaatttgg ctttcttgtc cattccctag	360
ccaaagttca gctagacctg cacaattggc atcattttca acataaaccg gaagatttaa	420
atgtttttgt agttctgtcc ccaatggata gccataaaga tcagttagag ctctgccag	480
taataatgtt cctttttgt cagaagttcc gggaacactt acaccaattg cagatactga	540
atgatgagct ttaactgat gaatatgtgt gagcaagcta tccataattt tttctttttt	600
taatgggggtt ggaacttgta aatgttgat gatcgtcca tcactagtta caagaccaa	660
ttttataaat gtaccaccga tatcaattcc tattgaataa tgcattcttt attacctctt	720
tctctaattt gtttttagtat agcaaaatca aaaaattaat tatggtatgc attatagata	780
tggtgtataa ttttcacaaa aacggagaaa actatgaaaa caatagaaca gctcatgata	840
gattcagcag atttaatgtc agattttatt caattgacaa tttttatatt ccgcaaggag	900
gattttcaac ttttttatag gagtgatgaa gaagagcaag ctttttcaag gtaatgactc	960
caacttattg atagtgtttt atgttcagat aatgccgat gactttgtca tgcagctcca	1020
ccgattttga gaacgacagc gacttccgtc ccagccgtgc caggtgctgc ctgagattca	1080
ggttatgccg ctcaattcgc tgcgtatata gcttgctgat tacgtgcagc tttcccttca	1140
ggcgggattc atacagcggc cagccatccg tcatccatat caccacgtca aagggtgaca	1200
gcaggctcat aagacgcccc agcgtcgcca tagtgcggtc accgaatacg tgcgcaacaa	1260
cgtcttccg gagactgtca tacgcgtaaa acagccagcg ctggcgcgat ttagccccga	1320

catagcecca ctgttcgtcc atttcgcgc agacgatgac gtcactgcc ggctgtatgc	1380
gcgaggttac cgactgcgc ctgagttttt taagtgaagt aaaatcgtgt tgaggccaac	1440
gcccataatg cgggctgttg cccggcctcc aacgccattc atggccatat caatgatatt	1500
ctggtgcgta cggggttgag aagcgggtga agtgaactgc agttgccatg ttttacgga	1560
gtgagagcag agatagcgt gatgtccggc ggtgcttttg ccgttacgca ccacccgtc	1620
agtagctgaa caggaggag agctgataga aacagaagcc actggagcac ctcaaaaaa	1680
ccatcataca ctaaatacgt aagttggcag catcaccctt tttcaaaaaga aatcatcgt	1740
catttatctc agttgccctt gaaggaagag gtgaatttat tttatatgcc taagataaaa	1800
ggatatatta cttatttttc tgtatttggt aaagaggagt atcttctact tattttttaa	1860
ggacaagaaa aacttgcaaa taatcctttc ccggtgaag taaaacaatt attaaaaagt	1920
ggtattttac tctatcaaat gatttttcaa gaaaaattag attatgaaga attatttgag	1980
aaaaatcagc atattatttc tccattgctt gctgctaacc caattgaatg gaatgattcc	2040
aatacgtgag gaaagtaaat tcccataaaa catatctttt tgaaaaatat ttgggggaat	2100
gtgttattcg tggagatgtt gcagagttaa aaaaagcttt ttcaaattat atgaataaag	2160
gaactgctgg aaaattatct aataattcaa tgcgacataa gaaaaacatt ttgatttcag	2220
tcactactat gactactcgt tcggctatac agggaggatt acctgaagaa gaagcttttt	2280
tgatgagtga tttatatatt caagagcttg aagaattaac ggaattagaa gaaattagaa	2340
cgcttgccca taatgtgatg atcgattttg cagataaagt gaaacagcat cgatattgtc	2400
aggtttctta taaaatatta tcttgtcaaa agtatattgt taatcattta tacgaaaaac	2460
taagtgtgag tgaaattgca gaagagctac acatgaatat ttcttattta tcttcacaat	2520
tcaaaaaaga gacagggcaa acaattacaa actttattca ggagaagcga atagaagaag	2580
ctagagaatt aatccttttc tcagactatc ctttttcaag aattttatacc ttgttggttt	2640
tactgccaaa gtcattttat aaaaatattt aaaaaatata ctggaataac tccaaaaaag	2700
tttcaagatc agtatattta tcatgcctct acatcaatat atgattgaaa ttaaaaaaag	2760
acctagaatt tcaaaattga taaaatacat acctaaaata ttaattctgt actattacgg	2820
gtggagtatc tactgtataa tgagggtata aattatggaa gaaggagta aaactaaatt	2880
tattgatggt tttacgaatt aattaggata ttttttttaa aaaccaaaga aaacgcttac	2940
aaacgttaaa ggagtgaatc taaagatgga caaatttgaa aaatggctaa ataagacctt	3000
gatgccactt gcctcaaaaa tgaataaaaa tcatttcatt tcggcattaa gtgaagcatt	3060
tatgagatgt atgcccttaa cattagggat tgcattattg acaattatag gatactttcc	3120
agttcctgcc tgggtagatt tcttaaacct tattggactg gctcagcatt tttcagcagt	3180
tattggtgca gttaccagtg cgctagcaat ttatgtaact tataattttg cttattctta	3240
tgtaaatcgt catgaatata atggccatac ggccggttta ttatcaatcg caagtttggt	3300
aatgctaata ccacaaatta ttactgtccc tgtagtaaaa aacattccaa ccgaatttcc	3360

```

gaaatccgcg gtagttgaca gtgtgtcaaa tgttgaagca tttcaaacgg tatacacggg 3420
tagcacagga ttaattgtag caatcataat tggtttttatt gtttcattag tctatatata 3480
attgagcaaa agaaatttag ttatttaaatt accagctgga gttcctccaa tggttgtaga 3540
ttcactaagt ccagcaatta tttcaatggg gattttctgt ttgatgttcg ggattcgtgt 3600
gggattctct tatacgccat tccatgatat tttcaatttc tcaacacaac taattcaagc 3660
accgttgact ggtgctgtgg caaatccatg gggtcttatg ggcattctta cctttggtaa 3720
tttcttatgg ttcttttgga tccaccctaa tttaattggg ggaattttaa atccattgtt 3780
attaacaatg tcatatgcta atattgatgc ctatgctgcc ggaaaacctg taccatactt 3840
acaaatgatg attgtgtttg ctgtgggtgc gaacgcattg ggcggaagtg gaaatactta 3900
tgggttagtt atttcaatgt ttacggcaaa atctgaacgc tataaacaat tattaaaatt 3960
agggtgaatt cctagtattt tcaatatcag tgaaccatta ctttttggtc ttccaatgat 4020
gttaaactct cttttcttta ttcttttggt tttccaacca gcaattttag gaactgtagc 4080
attgggcttg gcaaagatat tatatattac aaatctgaat ccaatgacgg cacttcttcc 4140
ttggacgaca ccagcacctg tgagaatggc catttcaggt ggacttccat ttttgattat 4200
ttttgcaatc tgtttagtct tgaatgttct tatttactac ccattcttta aggtggcgta 4260
taataaagct ttagaagaag aaaaagcagc tgttgaatta gaggggttcag aaactgcctg 4320
atggatattt tttataaatc tggtttgaac aaattatatt gacatctctt tttctatcct 4380
gataattctg agagggttatt ttgggaaata ctattgaacc atatcgaggt gtgtggtata 4440
atgaagggaa ttaaaaaaga taggaaaatt tc atg act tac gca gat caa gtt 4493
                               Met Thr Tyr Ala Asp Gln Val
                               1                               5

ttt aaa caa aat atc caa aat atc cta gat aat ggt gtt ttt tca gaa 4541
Phe Lys Gln Asn Ile Gln Asn Ile Leu Asp Asn Gly Val Phe Ser Glu
10                               15                               20

aat gca aga cca aag tat aag gat ggt caa atg gcg aat agc aaa tat 4589
Asn Ala Arg Pro Lys Tyr Lys Asp Gly Gln Met Ala Asn Ser Lys Tyr
25                               30                               35

gtc act ggt tca ttc gtt act tat gat ttg caa aag ggg gag ttt cca 4637
Val Thr Gly Ser Phe Val Thr Tyr Asp Leu Gln Lys Gly Glu Phe Pro
40                               45                               50                               55

att acc act ttg cgt cca att cca atc aaa tct gct att aaa gaa ttg 4685
Ile Thr Thr Leu Arg Pro Ile Pro Ile Lys Ser Ala Ile Lys Glu Leu
60                               65                               70

atg tgg ata tac caa gac caa aca agt gaa ctt tct gtt ctc gaa gag 4733
Met Trp Ile Tyr Gln Asp Gln Thr Ser Glu Leu Ser Val Leu Glu Glu
75                               80                               85

aag tat gga gtc aaa tac tgg gga gaa tgg gga att ggt gat ggt acg 4781
Lys Tyr Gly Val Lys Tyr Trp Gly Glu Trp Gly Ile Gly Asp Gly Thr
90                               95                               100

att ggg caa cgt tat ggt gca aca gtc aaa aaa tat aat atc att ggt 4829
Ile Gly Gln Arg Tyr Gly Ala Thr Val Lys Lys Tyr Asn Ile Ile Gly
105                               110                               115

```

aaa tta tta gaa ggc ttg gcc aaa aat cca tgg aat cgt cgt aat atc Lys Leu Leu Glu Gly Leu Ala Lys Asn Pro Trp Asn Arg Arg Asn Ile 120 125 130 135	4877
atc aac ctt tgg cag tat gaa gat ttt gag gaa aca gaa ggt ctt tta Ile Asn Leu Trp Gln Tyr Glu Asp Phe Glu Glu Thr Glu Gly Leu Leu 140 145 150	4925
cca tgt gct ttc caa acg atg ttt gat gtc cgt cga gaa aaa gat ggt Pro Cys Ala Phe Gln Thr Met Phe Asp Val Arg Arg Glu Lys Asp Gly 155 160 165	4973
cag att tat ttg gat gcc aca ctg att caa cgt tca aac gat atg ctt Gln Ile Tyr Leu Asp Ala Thr Ile Gln Arg Ser Asn Asp Met Leu 170 175 180	5021
gta gcc cac cat atc aat gcg atg caa tat gtt gct ttg caa atg atg Val Ala His His Ile Asn Ala Met Gln Tyr Val Ala Leu Gln Met Met 185 190 195	5069
att gca aaa cat ttt tct tgg aaa gtt ggg aaa ttc ttt tat ttt gta Ile Ala Lys His Phe Ser Trp Lys Val Gly Lys Phe Phe Tyr Phe Val 200 205 210 215	5117
aat aat tta cat att tat gat aat cag ttt gag cag gca aat gaa tta Asn Asn Leu His Ile Tyr Asp Asn Gln Phe Glu Gln Ala Asn Glu Leu 220 225 230	5165
atg aag cga aca gct tct gaa aaa gaa cct cgt ttg gtc ctt aat gtt Met Lys Arg Thr Ala Ser Glu Lys Glu Pro Arg Leu Val Leu Asn Val 235 240 245	5213
cct gat ggt aca aac ttt ttc gat att aaa cct gaa gat ttt gaa ctt Pro Asp Gly Thr Asn Phe Phe Asp Ile Lys Pro Glu Asp Phe Glu Leu 250 255 260	5261
gtg gac tat gag cca gta aaa cct caa ttg aaa ttt gat tta gca att Val Asp Tyr Glu Pro Val Lys Pro Gln Leu Lys Phe Asp Leu Ala Ile 265 270 275	5309
taa attaactctat aagttactga caaaactgtc agtaactttt tttgtgggaa	5362
aaatgtatttt ttatgaccgt aaagaatctg tcagtagaag tctgaaattc gtttaaaaaat	5422
cgactagaat aggctttaac gacaagatgt tttaaagagt acgctctaaa tgtatttttg	5482
tattttttgtt tgattacgaa gtttaaattt aattgacaaa tgttttaaaa tgagtataat	5542
aggacttgta accgatttta tttttataaa ggagaaagaa agatgaacaa acttttactt	5602
ggaacagcct ttataggggc tagcttactg attggtgggg gtgctcatgc agatcaaatg	5662
tttatcgttt gtataatcat aatactggtg agcactctat acaactagtg ggacacccaa	5722
agaatgctaa tgtaagtgcg ggttggaactt atgaaggtgt cggttggatc gcaccaacaa	5782
caagttcaag ccagttttac cgtgtgtaca atccaaatgc attattacac aaaaagcaag	5842
tatgaagccc aaagtttagt aaataagggt tggaaatggg ataataacgg aaaggcggtc	5902
ttctattctg gaggttctca agccgtatat gtcgcttata atcccaatgc acaatctggc	5962
gctcacaatt acacggaaaag tagctttgag caaaatagct tattgaatac tggttggaaa	6022
tatggggcag tagcttggtg cgggattgga gtaaaaaacg aaatgttaaa cattgctcaa	6082
attgtagtg gtaatttttc tagtattggt ggaacttga aagatacttc tggaaatatg	6142

```

cttgaaatta atgcaatggg aaatcttact ttaatatgga aaggggcaaa gaatcaaacc 6202
tttgaacttg ggcgaggtca acaatttaat ggaactgcag atattgcctt aaaaaatgga 6262
gagatttccc ctggtagtcc acttaacatt tttgtgttac caacagaagt tgctttccct 6322
aataataaaa aagtagacga ttcaactggg caacaacgaa tttttgtgaa ttattctggt 6382
acaagccctc aaatggcgaa tagtatggca gcggtggctt tttttagagt tattccatga 6442
ttatattaaa gttagaattg aataaaatgt attattaaaa agataatatt atatcacgac 6502
aaggcgacat ctatcaactt taccactggg atggaagtga ccattattac atcaggaaac 6562
gctaaaacgg ttgtttttac acccgtaaaa taaataataa aataatgtgn aattactgac 6622
agcattttgt cagtaatttt ttttatcaaa atcacacaaa aatgttcggt gacgaacaaa 6682
aaaaactatg ttataataat tcgtatgca actaaaaaag aagcgattgg ccgactttta 6742
aaagtagcca gcaaccaa atgtctcgagaa tttgataatt ttgcagctca acttgatttg 6802
acaggtcagc aaatgtcaat ttttagatttt cttggaaatc aaagcgaaga aggttcagga 6862
aaagaaatta gtcagacgat gattgaatta gaatttaata tccgacgttc aacaacgacg 6922
gaaattttac agcgcatgga aaagcggctt ttaattaatc gaagaacaag cctgaccgat 6982
gcccgccaaa aatcagttga attaactgaa gaagggaaaa gatatttacc tgaaatcagg 7042
gcttatatcc aagcacataa taaaaaagct tggcgtaatc atggtcatag ctgtttncct 7102
ggttaggngg gccannnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn cnnnc 7157

```

<210> 4

<211> 279

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> 'n' may be any base

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> 'n' may be any base

<220>

<221> misc_feature

<222> (6612)..(6612)

<223> 'n' may be any base

<220>

<221> misc_feature

<222> (7099)..(7099)

<223> 'n' may be any base

<220>

<221> misc_feature

<222> (7110)..(7110)
 <223> 'n' may be any base

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7117)..(7141)
 <223> 'n' may be any base

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7143)..(7147)
 <223> 'n' may be any base

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7149)..(7156)
 <223> 'n' may be any base

<400> 4

Met Thr Tyr Ala Asp Gln Val Phe Lys Gln Asn Ile Gln Asn Ile Leu
 1 5 10 15

Asp Asn Gly Val Phe Ser Glu Asn Ala Arg Pro Lys Tyr Lys Asp Gly
 20 25 30

Gln Met Ala Asn Ser Lys Tyr Val Thr Gly Ser Phe Val Thr Tyr Asp
 35 40 45

Leu Gln Lys Gly Glu Phe Pro Ile Thr Thr Leu Arg Pro Ile Pro Ile
 50 55 60

Lys Ser Ala Ile Lys Glu Leu Met Trp Ile Tyr Gln Asp Gln Thr Ser
 65 70 75 80

Glu Leu Ser Val Leu Glu Glu Lys Tyr Gly Val Lys Tyr Trp Gly Glu
 85 90 95

Trp Gly Ile Gly Asp Gly Thr Ile Gly Gln Arg Tyr Gly Ala Thr Val
 100 105 110

Lys Lys Tyr Asn Ile Ile Gly Lys Leu Leu Glu Gly Leu Ala Lys Asn
 115 120 125

Pro Trp Asn Arg Arg Asn Ile Ile Asn Leu Trp Gln Tyr Glu Asp Phe
 130 135 140

Glu Glu Thr Glu Gly Leu Leu Pro Cys Ala Phe Gln Thr Met Phe Asp
 145 150 155 160

Val Arg Arg Glu Lys Asp Gly Gln Ile Tyr Leu Asp Ala Thr Leu Ile
 165 170 175

Gln Arg Ser Asn Asp Met Leu Val Ala His His Ile Asn Ala Met Gln
 180 185 190

Tyr Val Ala Leu Gln Met Met Ile Ala Lys His Phe Ser Trp Lys Val
 195 200 205

Gly Lys Phe Phe Tyr Phe Val Asn Asn Leu His Ile Tyr Asp Asn Gln
 210 215 220

DE 602 12 825 T2 2007.01.11

Phe Glu Gln Ala Asn Glu Leu Met Lys Arg Thr Ala Ser Glu Lys Glu
225 230 235 240

Pro Arg Leu Val Leu Asn Val Pro Asp Gly Thr Asn Phe Phe Asp Ile
245 250 255

Lys Pro Glu Asp Phe Glu Leu Val Asp Tyr Glu Pro Val Lys Pro Gln
260 265 270

Leu Lys Phe Asp Leu Ala Ile
275

<210> 5

<211> 7094

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> CDS

<222> (4469)..(5305)

<223>

<400> 5

```

ggttttccca gtccgacgtt gtaaaacgac ggccagtga ttcattaaca gccttttgag      60
cagctagctc attattttga aataaatcat aaatttcttt cccactatct gatttatgat      120
tgctagcata tttgttgtat aatcgaacga gtocattttg aacagatcca tatagattga      180
gtgaactata aaatacatct atatcatagt tgagtttggt cacaatcatg agaccaaatt      240
ctccagcatt tcgtgtagaa ccacgataaa gctgtttatt tagcaaaatg gcacctccga      300
cacctgtacc taaagtcacg caaataaaaat tttggctttc ttgtccattc cctagccaaa      360
gttcagctag acctgcacaa ttggcatcat tttcaacata aaccggaaga tttaaatggt      420
tttgtagttc tgtcccaat ggatagccat aaagatcagt tagagctcct gccagtaata      480
atgttcocctt tttgtcagaa gttccgggaa cacttacacc aattgcagat actgaatgat      540
gagcttttaa ctgatgaata tttgtgagca agctatccat aattttttct ttttttaatg      600
gggttggaac ttgtaaatgt tgtatgatcg ttccatcact agttacaaga ccaaatttta      660
taaatgtacc accgatatca attcctattg aataatgcat cttttattac ctctttctct      720
aatttgtttt agtatagcaa aatcaaaaaa ttaattatgg tatgcattat agatatgttg      780
tataattttc acaaaaacgg agaaaactat gaaaacaata gaacagctca tgatagattc      840
agcagattta atgtcagatt ttattcaatt gacaattttt atattccgca aggaggattt      900
tcaacttttt tataggagtg atgaagaaga gcaagctttt tcaaggtaat gactccaact      960
tattgatagt gttttatggt cagataatgc ccgatgactt tgtcatgcag ctccaccgat     1020
tttgagaacg acagegactt ccgtcccagc cgtgccaggt gctgectcag attcagggtta     1080
tgccgctcaa ttcgctgcgt atatcgcttg ctgattacgt gcagctttcc cttcaggcgg     1140

```

gattcataca gggccagcc atccgtcatc catatcacca cgtcaaaggg tgacagcagg	1200
ctcataagac gcccacgct cgccatagtg cgttcaccga atacgtgcgc aacaaccgtc	1260
ttccggagac tgtcatatgc gtaaaacagc cagcgctggc gcgatttagc cccgacatag	1320
cccactgtt cgtccatttc cgcgcagacg atgacgtcac tgcccggctg tatgcgcgag	1380
gttacccgact ggggcctgag ttttttaagt gacgtaaaat cgtgttgagg ccaacgcccc	1440
taatgcgggc tgttgcccgg catccaaacg cattcatggc catatcaatg attttctggt	1500
gcgtaccggg ttgagaagcg gtgtaagtga actgcagttg ccatgtttta cggcagtgag	1560
agcagagata ggcctgatgt cggcggtgc ttttgcggtt acgcaccacc ccgtcagtag	1620
ctgaacagga gggacagctg atagaaacag aagccactgg agcacctcaa aaacaccatc	1680
atacactaaa tcagtaagtt ggcagcatca ccctttttca aaagaaatca tcgctcattt	1740
atctcagttg cccttgaagg aagaggtgaa tttattttat atgcctaaga taaaaggata	1800
tattacttat tttctgtat ttggtaaaga ggagtatctt ctacttattt ttaaaggaca	1860
agaaaaactt gcaaataatc ctttccccgt tgaagtaaaa caattattaa aaagtggat	1920
tttactctat caaatgattt ttcaagaaaa attagattat gaagaattat ttgagaaaaa	1980
tcagcatatt atttctccat tgcttgctgc taaaccaatt gaatggaatg attccaatac	2040
gtgaggaaag taaattccca taaaacatat ctttttgaaa aatatttggg ggaatgtgtt	2100
attcgtggag atgttgacga gttaaaaaaa gctttttcaa attatatgaa taaaggaact	2160
gctggaaaat tatctaataa ttcaatgcga cataagaaaa acattttgat ttcagtcac	2220
actatgacta ctgcgttcggc tatacaggga ggattacctg aagaagaagc ttttttgatg	2280
agtgatttat atattcaaga gcttgaagaa ttaacggaat tagaagaaat tagaacgctt	2340
gcctataatg tgatgatcga ttttgcatat aaagtgaac agcatcgata ttgtcagggt	2400
tcttataaaa tatttatcttg tcaaaagtat attgttaatc atttatacga aaaactaagt	2460
gtgagtgaat tgcagaaga gctacacatg aatatttctt atttatcttc acaattcaaa	2520
aaagagacag ggcaaacaat tacaaaacttt attcaggaga agcgaataga agaagctaga	2580
gaattaatcc ttttctcaga ctatcctttt tcaagaattt ataccttggt ggttttactg	2640
ccaaagtcac tttataaaaa tatttaaaaa atatactgga ataactccca aaaagtttca	2700
agatcagtat atttatcatg cctctacatc aatatatgat tgaaattaaa aaaagacct	2760
gaatttcaaa attgataaaa tacataccta aaatattaat tctgtactat tacgggtgga	2820
gtatctactg tataatgagg gtataaatta tggaagaagg gagtaaaact aaatttattg	2880
atggttttac gaattaatta ggatattttt tttaaaaacc aaagaaaacg cttacaaacg	2940
ttaaaggagt gaatctaaag atggacaaat ttgaaaaatg gctaaataag accttgatgc	3000
caottgcctc aaaaatgaat aaaaatcatt tcatttcggc attaatgaa gcatttatga	3060
gatgtatgcc cttaacatta gggattgcat tattgacaat tataggatac tttccagttc	3120
ctgcctgggt agatttctta aactctattg gactggctca gcatttttca gcagttattg	3180

gtgcagttac cagtgcgcta gcaatztatg taacttataa ttttgcttat tcttatgtaa	3240
atcgatcatga atataatggc catacggcgc gtttattatc aatcgcaagt ttgttaatgc	3300
taatgccaca aattattact gtccctgtag taaaaaacat tccaaccgaa tttccgaaat	3360
ccgcggtagt tgacagtgtg tcaaatggtg aagcatttca aacgggtatac acgggtagca	3420
caggattaat tgtagcaatc ataattgggtt ttattgtttc attagtctat atacaattga	3480
gcaaaaagaaa tttagttatt aaattaccag ctggagttcc tccaatgggt gtagattcac	3540
taagtccagc aattatttca atgggtgattt tctgtttgat gttcgggatt cgtgtgggat	3600
tctcttatac gccattccat gatattttca atttctcaac acaactaatt caagcacctg	3660
tgactgggtgc tgtggcaaat ccatgggttc ttatgggcat ctttaccttt ggtaatttct	3720
tatggttcctt tgggtatccac cctaatttaa ttgggggaat tttaaatcca ttgtatttaa	3780
caatgtcata tgctaataat gatgcctatg ctgccggaaa acctgtacca tacttacaaa	3840
tgatgattgt gtttgcctgtg ggtgcgaacg catggggcgg aagtggaaat acttatgggt	3900
tagttatttc aatgtttacg gcaaaatctg aacgcataa acaattatta aaattagggtg	3960
caattccatg tattttcaat atcagtgaac cattactttt tggctctcca atgatgttaa	4020
atcctctttt ctttattcct ttgggtttcc aaccagcaat tttaggaact gtagcattgg	4080
gcttggcaaa gatatttatat attacaaatc tgaatccaat gacggcactt cttccttgga	4140
cgacaccagc acctgtgaga atggccattt cagggtggact tccatttttg attatttttg	4200
caatctgttt agtcttgaat gttcttattt actaccatt ctttaagggtg gcgtataata	4260
aagctttaga agaagaaaaa gcagctgttg aattagaggg ttcagaaact gcctgatgga	4320
tattttttat aaatctgggt tgaacaaatt atattgacat ctctttttct atcctgataa	4380
ttctgagagg ttattttggg aaatactatt gaaccatatac gaggtgggtg ggtataatga	4440
agggaaattaa aaaagatagg aaaatttc atg act tac gca gat caa gtt ttt	4492
Met Thr Tyr Ala Asp Gln Val Phe	
1 5	
aaa caa aat atc caa aat atc cta gat aat ggt gtt ttt tca gaa aat	4540
Lys Gln Asn Ile Gln Asn Ile Leu Asp Asn Gly Val Phe Ser Glu Asn	
10 15 20	
gca aga cca aag tat aag gat ggt caa atg gcg aat agc aaa tat gtc	4588
Ala Arg Pro Lys Tyr Lys Asp Gly Gln Met Ala Asn Ser Lys Tyr Val	
25 30 35 40	
act ggt tca ttc gtt act tat gat ttg caa aag ggg gag ttt cca att	4636
Thr Gly Ser Phe Val Thr Tyr Asp Leu Gln Lys Gly Glu Phe Pro Ile	
45 50 55	
acc act ttg cgt cca att cca atc aaa tct gct att aaa gaa ttg atg	4684
Thr Thr Leu Arg Pro Ile Pro Ile Lys Ser Ala Ile Lys Glu Leu Met	
60 65 70	
tgg ata tac caa gac caa aca agt gaa ctt tct gtt ctc gaa gag aag	4732
Trp Ile Tyr Gln Asp Gln Thr Ser Glu Leu Ser Val Leu Glu Glu Lys	
75 80 85	
tat gga gtc aaa tac tgg gga gaa tgg gga att ggt gat ggt acg att	4780
Tyr Gly Val Lys Tyr Trp Gly Glu Trp Gly Ile Gly Asp Gly Thr Ile	

90	95	100	
ggg caa cgt tat ggt gca aca gtc aaa aaa tat aat atc att ggt aaa Gly Gln Arg Tyr Gly Ala Thr Val Lys Lys Tyr Asn Ile Ile Gly Lys 105 110 115 120			4828
tta tta gaa ggc ttg gcc aaa aat cca tgg aat cgt cgt aat atc atc Leu Leu Glu Gly Leu Ala Lys Asn Pro Trp Asn Arg Arg Asn Ile Ile 125 130 135			4876
aac ctt tgg cag tat gaa gat ttt gag gaa aca gaa ggt ctt tta cca Asn Leu Trp Gln Tyr Glu Asp Phe Glu Glu Thr Glu Gly Leu Leu Pro 140 145 150			4924
tgt gct ttc caa acg atg ttt gat gtc cgt cga gaa aaa gat ggt cag Cys Ala Phe Gln Thr Met Phe Asp Val Arg Arg Glu Lys Asp Gly Gln 155 160 165			4972
att tat ttg gat gcc aca ctg att caa cgt tca aac gat atg ctt gta Ile Tyr Leu Asp Ala Thr Leu Ile Gln Arg Ser Asn Asp Met Leu Val 170 175 180			5020
gcc cac cat atc aat gcg atg caa tat gtt gct ttg caa atg atg att Ala His His Ile Asn Ala Met Gln Tyr Val Ala Leu Gln Met Met Ile 185 190 195 200			5068
gca aaa cat ttt tct tgg aaa gtt ggg aaa ttc ttt tat ttt gta aat Ala Lys His Phe Ser Trp Lys Val Gly Lys Phe Phe Tyr Phe Val Asn 205 210 215			5116
aat tta cat att tat gat aat cag ttt gag cag gca aat gaa tta atg Asn Leu His Ile Tyr Asp Asn Gln Phe Glu Gln Ala Asn Glu Leu Met 220 225 230			5164
aag cga aca gct tct gaa aaa gaa cct cgt ttg gtc ctt aat gtt cct Lys Arg Thr Ala Ser Glu Lys Glu Pro Arg Leu Val Leu Asn Val Pro 235 240 245			5212
gat ggt aca aac ttt ttc gat att aaa cct gaa gat ttt gaa ctt gtg Asp Gly Thr Asn Phe Phe Asp Ile Lys Pro Glu Asp Phe Glu Leu Val 250 255 260			5260
gac tat gag cca gta aaa cct caa ttg aaa ttt gat tta gca att Asp Tyr Glu Pro Val Lys Pro Gln Leu Lys Phe Asp Leu Ala Ile 265 270 275			5305
taaattaatc tataagttac tgacaaaact gtcagtaact ttttttgtgg gaaaaatgta			5365
tttttatgac cgtaaagaat ctgtcagtag aagtctgaaa ttctgtttaa aatcgactag			5425
aataggcttt aacgacaaga tgttttaaa agtacgctct aaatgtattt ttgtattttt			5485
gtttgattac gaagtttaaa tttaattgac aaatgtttta aaatgagtat aataggactt			5545
gtaaccgatt ttatttttat aaaggagaaa gaaagatgaa caaactttta cttggaacag			5605
ccttttatagg ggctagctta ctgattggtg ggggtgctca tgcagatcaa atgtttatcg			5665
tttggtataat cataatactg gtgagcactc tatacaacta gtgggacacc aaaagaatgc			5725
taatgtaagt gcgggttggc cttatgaagg tgcgggttgg atcgaccaa caacaagttc			5785
aagcccagtt taccgtgtgt acaatccaaa tgcattatta cacaaaaagc aagtatgaag			5845
cccaaagttt agtaaataag ggttggaat gggataataa cggaaaggcg gtcttctatt			5905
ctggaggttc tcaagccgta tatgtcgctt ataatcccaa tgcacaatct ggcgctcaca			5965

```

attacacgga aagtagcttt gagcaaaata gcttattgaa tactggttgg aaatatgggg 6025
cagtagcttg gtacgggatt ggagtaaaaa acgaaatggt aaacattgct caaattgtta 6085
gtggtaattt ttctagtatt gttggaactt ggaaagatac ttctggaaat atgcttgaaa 6145
ttaatgcaat gggaaatctt actttaatat ggaaaggggc aaagaatcaa acctttgaac 6205
ttggcgagcagg tcaacaattt aatggaactg cagatattgc cttaaaaaat ggagagattt 6265
cccctggtag tccacttaac atttttgttg taccaacaga agttgctttc cctaataata 6325
aaaaagtaga cgattcaact gggcaacaac gaatttttgt gaattattct ggtacaagcc 6385
ctcaaatggc gaatagtatg gcagcgggtg ctttttttag agttattcca tgattatatt 6445
aaagttagaa ttgaataaaa tgtattatta aaaagataat attatatcac gacaaggcga 6505
catctatcaa ctttaccact ggtatggaag tgaccattat tacatcagga aacgctaaaa 6565
cggttgtttt tacaccgta aaataaataa taaaataatg tgaaattact gacagcattt 6625
tgtcagtaat tttttttatc aaaatcacac aaaaatgttc gttgacgaac aaaaaaact 6685
atgttataat aattcgtatg cgaactaaaa aagaagcgat tggccgactt taaaagtag 6745
ccagcaacca aatgtctcga gaatttgata attttgcagc tcaacttgat ttgacaggtc 6805
agcaaagtgc aatttttagat tttcttgga atcaaagcga agaagggtca ggaaaagaaa 6865
ttagtcagac gatgattgaa ttagaattta atatccgacg ttcaacaacg acggaaattt 6925
tacagcgcat ggaaaagcgg cttttaatta atcgaagaac aagcctgacc gatgcccgcc 6985
aaaaatcagt tgaattaact gaagaaggga aaagatatat acctgaaatc agggcttata 7045
tccaagcaca taataaaaaa gcttggcgta atcatggtca tagctgttt 7094

```

<210> 6

<211> 279

<212> PRT

<213> Lactococcus lactis

<400> 6

```

Met Thr Tyr Ala Asp Gln Val Phe Lys Gln Asn Ile Gln Asn Ile Leu
1           5           10           15

```

```

Asp Asn Gly Val Phe Ser Glu Asn Ala Arg Pro Lys Tyr Lys Asp Gly
          20           25           30

```

```

Gln Met Ala Asn Ser Lys Tyr Val Thr Gly Ser Phe Val Thr Tyr Asp
35           40           45

```

```

Leu Gln Lys Gly Glu Phe Pro Ile Thr Thr Leu Arg Pro Ile Pro Ile
50           55           60

```

```

Lys Ser Ala Ile Lys Glu Leu Met Trp Ile Tyr Gln Asp Gln Thr Ser
65           70           75           80

```

```

Glu Leu Ser Val Leu Glu Glu Lys Tyr Gly Val Lys Tyr Trp Gly Glu
          85           90           95

```

DE 602 12 825 T2 2007.01.11

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

<210> 7

<211> 1000

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<400> 7

```

atatacaatt gagcaaaaga aatttagtta ttaaattacc agctggagtt cctccaatgg      60
ttgtagattc actaagtcca gcaattatTT caatgggtgat tttctgtttg atgttcggga    120
ttcgtgtggg attctcttat acgccattcc atgatatTTT caatttctca acacaactaa    180
ttcaagcacc gttgactggg gctgtggcaa atccatgggt tcttatgggc atctttacct    240
ttggtaattt cttatgggtc tttggtatcc accctaattt aattggggga attttaaate    300
cattgttatt aacaatgtca tatgctaata ttgatgccta tgctgccgga aaacctgtac    360

```

```

catacttaca aatgatgatt gtgtttgctg tgggtgCGaa cgcattggggc ggaagtggaa    420
atacttatgg gttagtattt tcaatgttta cggcaaaatc tgaacgctat aaacaattat    480
taaaaattagg tgcaattcct agtatTTTca atatcagtga accattactt tttggtcttc    540
caatgatggt aaatcctctt ttctttatTC ctttggTTTT ccaaccagca attttaggaa    600
ctgtagcatt gggcttggca aagatattat atattacaaa tctgaatcca atgacggcac    660
ttcttccttg gacgacacca gcacctgtga gaatggccat ttcaggtgga cttccatttt    720
tgattatttt tgcaatctgt ttagtcttga atgttcttat ttactacca ttctttaagg    780
tggcgataaa taaagcttta gaagaagaaa aagcagctgt tgaattagag ggttcagaaa    840
ctgctgatg gatattTTTT ataaatctgg tttgaacaaa ttatattgac atctctTTTT    900
ctatcctgat aattctgaga gggtattttg ggaaatacta ttgaaccata tcgaggtggt    960
gtggtataat gaagggaatt aaaaaagata ggaaaatttc                                1000

```

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer

<400> 8

atgacttacg cagatcaagt tttt 24

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer

<400> 9

ttaaattgct aaatcaaatt tcaattg 27

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer

<400> 10

tctgattgag taccttgacc 20

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer

<400> 11

gcaatcataa ttggtttat tg 22

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer

<400> 12

cttacatgac tatgaaaac cg 22

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide primer

<400> 13

cttttttatt attagggaaa gca 23

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> expression unit comprising the lactococcal P1 promoter, the E.col i bacteriophage T7 expression signals, putative RNA stabilising sequence and modified gene10 ribosomal binding site

<400> 14

gattaagtca tcttacctct t 21

<210> 15

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> thyA-, P1-T7-usp45-hIL10

<400> 15

agataggaaa atttcatgga ttaagtcatac ttacctctt 39

<210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ATG not included, thyA-, P1-T7-usp45-hIL10

<400> 16

agataggaaa atttcgatta agtcataccta cctctt 36

<210> 17

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> thyA promoter not included, theA-, P1-T7-usp45-hIL10

<400> 17

tctgagaggt tattttggga aatactagat taagtcatac ttacctctt 48

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> thyA-, usp45-hIL10

<400> 18

aaaatccgta actaactaga attaatctat aagtactga 40

<210> 19

<211> 6967

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> misc feature

<223> Thy11

<400> 19

DE 602 12 825 T2 2007.01.11

attaacagcc ttttgagcag ctagctcatt attttgaaat aaatcataaa tttctttccc	60
actatctgat ttatgattgc tagcatattt gttgtataat cgaacgagtc ctttttgaac	120
agatccatat agattgagtg aactataaaa tacatctata tcatagttga gtttgttcac	180
aatcatgaga ccaaattctc cagcatttcg tgtagaacca cgataaagct gtttatttag	240
caaaatggca cctccgacac ctgtacctaa agtcatgcaa ataaaatfff ggctttcttg	300
tccattccct agccaaagtt cagctagacc tgcacaattg gcatcatttt caacataaac	360
cggaagattt aaatgttttt gtagttctgt ccccaatgga tagccataaa gatcagttag	420
agctcctgcc agtaataatg ttcccttttt gtcagaagtt ccgggaacac ttacaccaat	480
tgcagatact gaatgatgag cttttaactg atgaatattt gtgagcaagc tatccataat	540
tttttctttt tttaatgggg ttggaacttg taaatgttgt atgacgttc catcactagt	600
tacaagacca aatffffataa atgtaccacc gatatcaatt cctattgaat aatgcatctt	660
ttattacctc tttctctaatt ttgttttagt atagcaaaat caaaaaatta attatgggtat	720
gcattataga tatgttgtat aatffffcaca aaaacggaga aaactatgaa aacaatagaa	780
cagctcatga tagattcagc agatttaatg tcagatttta ttcaattgac aatffffata	840
ttcgcgaagg aggattttca actfffftat aggagtgatg aagaagagca agctffffca	900
aggtaatgac tccaacttat tgatagtgtt ttatgttcag ataatgcccg atgactttgt	960
catgcagctc caccgatttt gagaacgaca gcgacttccg tcccagccgt gccagggtgt	1020
gcctcagatt caggtttatgc cgctcaattc gctgcgtata tcgcttgctg attacgtgca	1080

gctttccctt caggcgggat tcatacagcg gccagccatc cgtcatccat atcaccacgt	1140
caaaggggtga cagcaggctc ataagacgcc ccagcgtcgc catagtgcgt tcaccgaata	1200
cgtgcgcaac aaccgtcttc cggagactgt catacgcgta aaacagccag cgctggcgcg	1260
atthagcccc gacatagccc cactgttcgt ccatttccgc gcagacgatg acgtcactgc	1320
cgggctgtat gcgcgagggt accgactgcg gcctgagttt tttaagtgc gtaaaatcgt	1380
gttgaggcca acgcccataa tgcgggctgt tgcccggcat ccaacgccat tcatggccat	1440
atcaatgatt ttctggtgcg taccgggttg agaagcgggt taagtgaact gcagttgcc	1500
tgttttacgg cagtgcgagc agagatagcg ctgatgtccg gcggtgcttt tgccgttacg	1560
caccaccccg tcagtagctg aacaggaggg acagctgata gaaacagaag ccaactggagc	1620
acctcaaaaa caccatcata cactaaatca gtaagttggc agcatcacc tttttcaaaa	1680
gaaatcatcg ctcatctatc tcagttgccc ttgaaggag aggtgaattt attttatatg	1740
cctaagataa aaggatatat tacttatttt tctgtatttg gtaaagagga gtatcttcta	1800
cttattttta aaggacaaga aaaacttgca aataatcctt tcccgttgga agtaaaacaa	1860
ttattaaaaa gtggtatttt actctatcaa atgatttttc aagaaaaatt agattatgaa	1920
gaattatttg agaaaaatca gcatattatt tctccattgc ttgctgctaa accaattgaa	1980
tggaatgatt ccaatacgtg aggaaagtaa attcccataa aacatatctt tttgaaaaat	2040
atgtggggga atgtgttatt cgtggagatg ttgcagagtt aaaaaagct ttttcaaatt	2100
atatgaataa aggaactgct ggaaaattat ctaataattc aatgcgacat aagaaaaaca	2160
ttttgatttc agtcatcact atgactactc gttcggctat acaggaggga ttacctgaag	2220
aagaagcttt tttgatgagt gatttatata ttcaagagct tgaagaatta acggaattag	2280
aagaaattag aacgcttgcc tataatgtga tgatcgattt tgcagataaa gtgaaacagc	2340
atcgatattg tcaggtttct tataaaatat tatcttgtca aaagtatatt gttaatcatt	2400
tatacgaaaa actaagtgtg agtgaaattg cagaagagct acacatgaat atttcttatt	2460
tatcttcaca attcaaaaaa gagacagggc aaacaattac aaactttatt caggagaagc	2520
gaatagaaga agctagagaa ttaatccttt tctcagacta tcctttttca agaatttata	2580
ccttgttggt tttactgcc aagtcatttt ataaaaatat ttaaaaaata tactggaata	2640
actocaaaaa agtttcaaga tcagtatatt tatcatgcct ctacatcaat atatgattga	2700
aattaaaaaa agacctagaa tttcaaaatt gataaaatac atacctaaaa tattaattct	2760
gtactattac gggtgaggta tctactgtat aatgagggtg taaattatgg aagaaggag	2820
taaaactaaa tttattgatg gttttacgaa ttaattagga tatttttttt aaaaaccaa	2880
gaaaacgctt acaaacgtta aaggagtga tctaaagatg gacaaatttg aaaaatggct	2940
aaataagacc ttgatgccac ttgcctcaaa aatgaataaa aatcatttca tttcggcatt	3000
aagtgaagca tttatgagat gtatgccctt aacattaggg attgcattat tgacaattat	3060
aggatacttt ccagttcctg cctgggtaga tttcttaaac tctattggac tggctcagca	3120

tttttcagca gttattggtg cagttaccag tgcgctagca atttatgtaa cttataattt	3180
tgcttattct tatgtaaatc gtcatgaata taatggccat acggccgggt tattatcaat	3240
cgcaagtttg ttaatgctaa tgccacaaat tattactgtc cctgtagtaa aaaacattcc	3300
aaccgaattt ccgaaatccg cggtagttga cagtgtgtca aatggtgaag catttcaaac	3360
ggtatacacg ggtagcacag gattaattgt agcaatcata attggtttta ttgtttcatt	3420
agtctatata caattgagca aaagaaattt agttattaaa ttaccagctg gagttcctcc	3480
aatggttgta gattcactaa gtccagcaat tatttcaatg gtgattttct gtttgatggt	3540
cgggattcgt gtgggattct cttatacgcc attccatgat attttcaatt tctcaacaca	3600
actaattcaa gcaccgttga ctgggtgctgt ggcaaatcca tgggttctta tgggcatctt	3660
tacctttggt aatttcttat ggttctttgg tatccaccct aatttaattg ggggaatttt	3720
aatccattg ttattaacaa tgtcatatgc taatattgat gcctatgctg ccggaaaacc	3780
tgtaccatac ttacaaatga tgattgtgtt tgctgtgggt gcgaacgcat ggggcggaag	3840
tggaataact tatgggttag ttatttcaat gtttacggca aaatctgaac gctataaaca	3900
attattaaaa ttagggtgcaa ttccatgtat tttcaatatc agtgaaccat tactttttgg	3960
tcttccaatg atgttaaadc ctcttttctt tattcctttg gttttccaac cagcaatttt	4020
aggaactgta gcattgggct tggcaaagat attatatatt acaaacttga atccaatgac	4080
ggcacttctt ccttgagca caccagcacc tgtgagaatg gccatttcag gtggacttcc	4140
atttttgatt atttttgcaa tctgtttagt cttgaatgtt cttatttact acccattctt	4200
taagggtggc tataataaag ctttagaaga agaaaaagca gctgttgaat tagaggggtc	4260
agaaactgcc tgatggatat tttttataaa tctggtttga acaaattata ttgacatctc	4320
tttttctatc ctgataattc tgagagggtta ttttgggaaa tactattgaa ccatatcgag	4380
gtggtgtggt ataatgaagg gaattaaaaa agataggaaa atttcatgga ttaagtcatc	4440
ttacctcttt tattagtttt ttcttataat ctaatgataa catttttata attaatctat	4500
aaaccatatc cctctttgga atcaaaattt attatctact cctttgtaga tatgttataa	4560
tacaagtatc agatctggga gaccacaacg gtttccact agaaataatt ttgtttaact	4620
ttagaaagga gatatacgca tgaaaaaaaa gattatctca gctattttta tgtctacagt	4680
catactttct gctgcagccc cgttgtcagg tgtttacgcc tcagctgggt aaggtactca	4740
atcagaaaac tcatgtactc actttccagg taacttgcca aacatgcttc gtgatttgcg	4800
tgatgctttt tcacgtgtta aaactttttt tcaaatgaaa gatcaacttg ataacttgct	4860
tttgaaagaa tcactttttg aagattttta aggttacctt gggtgtcaag ctttgtcaga	4920
aatgatccaa ttttaccttg aagaagtat gccacaagct gaaaaccaag atccagatat	4980
caaagctcac gttaactcat tgggtgaaaa ccttaaaaact ttgcgtcttc gtttgcgtcg	5040
ttgtcaccgt tttcttccat gtgaaaacaa atcaaaagct gttgaacaag ttaaaaacgc	5100
ttttaacaaa ttgcaagaaa aaggtatcta caaagctatg tcagaatttg atatctttat	5160

```

caactacatc gaagcttaca tgactatgaa aatccgtaac taactagaat taatctataa 5220
gttactgaca aaactgtcag taactttttt tgtgggaaaa atgtattttt atgaccgtaa 5280
agaatctgtc agtagaagtc tgaaattcgt ttaaaaatcg actagaatag gctttaacga 5340
caagatgttt taaagagtac gctctaaatg tttttttgta tttttgttg attacgaagt 5400
ttaaatttaa ttgacaaatg ttttaaaatg agtataatag gacttgtaac cgattttatt 5460
tttataaagg agaaagaaag atgaacaaac ttttacttgg aacagccttt ataggggcta 5520
gcttactgat tgggtgggggt gctcatgcag atcaaagtgt tatcgtttgt ataatacataa 5580
tactggtgag cactctatac aactagtggg acaccaaag aatgctaag taagtgcggg 5640
ttggacttat gaaggtgtcg gttggatcgc accaacaaca agttcaagcc cagtttacgg 5700
tgtgtacaat ccaaatgcat tattacaca aaagcaagta tgaagccaa agtttagtaa 5760
ataagggttg gaaatgggat aataacggaa aggcggctct ctattctgga ggttctcaag 5820
ccgtatatgt cgcttataat cccaatgcac aatctggcgc tcacaattac acggaaagta 5880
gctttgagca aaatagctta ttgaatactg gttggaaata tggggcagta gcttggtacg 5940
ggattggagt aaaaaacgaa atgttaaaca ttgctcaaat tgtagtggt aatttttcta 6000
gtattgttgg aacttggaag gatacttctg gaaatatgct tgaattaat gcaatgggaa 6060
atcttacttt aatatggaaa ggggcaaaga atcaaacctt tgaacttggc gcaggccaac 6120
aatttaatgg aactgcagat attgccttaa aaaatggaga gatttccctt gtagtccac 6180
ttaacatttt tgtgtgacca acagaagttg ctttccctaa taataaaaaa gtagacgatt 6240
caactgggca acaacgaatt tttgtgaatt attctggtac aagccctcaa atggcgaata 6300
gtatggcagc ggtggccttt tttagagtta ttccatgatt atattaaagt tagaattgaa 6360
taaaatgtat tattaataaag ataataattat atcacgacaa ggcgacatct atcaacttta 6420
ccactggtat ggaagtgacc attattacat caggaaacgc taaaacgggt gtttttacac 6480
ccgtaaaaata aataataaaa taatgtgaaa ttactgacag catthttgtca gtaatttttt 6540
ttatcaaaat cacacaaaaa tggtcggtga cgaacaaaaa aaactatgtt ataataattc 6600
gtatgcgaac taaaaaagaa gcgattggcc gacttttaaa agtagccagc aaccaaagt 6660
ctcgagaatt tgataatttt gcagctcaac ttgatttgac aggtcagcaa atgtcaattt 6720
tagattttct tggaaatcaa agcgaagaag gtccaggaaa agaaattagt cagacgatga 6780
ttgaattaga atttaatatc cgacgttcaa caacgacgga aattttacag cgcattggaaa 6840
agcggccttt aattaatcga agaacaagcc tgaccgatgc ccgcaaaaa tcagttgaat 6900
taactgaaga agggaaaaga tatttacctg aaatcagggc ttatatccaa gcacataata 6960
aaaaagc 6967

```

<210> 20

<211> 6753

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> misc_feature

<223> Thy12

<400> 20

attaacagcc ttttgagcag ctagctcatt attttgaaat aaatcataaa tttctttccc	60
actatctgat ttatgattgc tagcatatth gttgtataat cgaacgagtc cattttgaac	120
agatccatat agattgagtg aactataaaa tacatctata tcatagttga gtttgttcac	180
aatcatgaga ccaaattctc cagcatttcg tgtagaacca cgataaagct gtttatttag	240
caaaatggca cctcogacac ctgtacctaa agtcatgcaa ataaaattht ggctttcttg	300
tccattccct agccaaagtt cagctagacc tgcacaattg gcatcattht caacataaac	360
cggaagatth aatgtthtth gtagttctgt ccccaatgga tagccataaa gatcagttag	420
agctcctgcc agtaataatg ttccctthtth gtcagaagtt ccgggaacac ttacaccaat	480
tgcagatact gaatgatgag cttthtaactg atgaatatth gtgagcaagc tatccataat	540
tttttcttht tthaatgggg ttggaacttg taaatgttgat atgacgttc catcactagt	600
tacaagacca aatthtataa atgtaccacc gatatcaatt cctattgaat aatgcatctt	660
ttattacctc tttctctaath ttgtthtagt atagcaaaat caaaaaatta attatggtat	720
gcattataga tatgttgat aatthtcaca aaaacggaga aaactatgaa aacaatagaa	780
cagctcatga tagattcagc agatttaath tcagatthta ttcaattgac aatthttata	840
ttccgcaagg aggatthtca actthtthtth aggagtgatg aagaagagca agctthtthca	900
aggtaatgac tccaacttat tgatagtgtt ttatgttcag ataatgcccg atgactthgt	960
catgcagctc caccgattht gagaacgaca ggcacttccg tcccagccgt gccagggtgct	1020
gcctcagatt cagggttatgc cgctcaattc gctgcgtata tgccttgctg attacgtgca	1080
gctthccctt caggcgggat tcatacagcg gccagccatc cgatcatccat atcaccacgt	1140
caaaggggta cagcaggctc ataagacgcc ccagcgtcgc catagtgcgt tcaccgaata	1200
cgtgcgcaac aaccgtcttc cggagactgt catacgcgt aacacagccag cgctggcgcg	1260
atthtagccc gacatagccc cactgttcgt ccatttccgc gcagacgatg acgtcactgc	1320
ccggctgtat gcgcgaggtt accgactgcg gcctgagtht tthaatgac gtaaaatcgt	1380
gttgaggcca acgcccataa tgccggctgt tgcccgcat ccaacgccat tcatggccat	1440
atcaatgatt ttctggtgcg taccgggttg agaagcgtg taagtgaact gcagttgcca	1500
tgthttacgg cagtgagagc agagatagcg ctgatgtccg gcggtgctth tgccgttacg	1560
caccaccccg tcagtagctg aacaggaggg acagctgata gaaacagaag ccactggagc	1620
acctcaaaaa caccatcata cactaaatca gtaagttggc agcatcacc tthttcaaaa	1680
gaaatcatcg ctcatthtth tcagttgccc ttgaaggag aggtgaatth atthtatatg	1740
cctaagataa aaggatatat tacttattht tctgtatthg gtaagagga gtatcttcta	1800
cttatthtth aaggacaaga aaaacttgca aataatcctt tccccgttga agtaaaacaa	1860

ttattaaaaa	gtgggtat	ttt actctatcaa	atgatttttc	aagaaaaatt	agattatgaa	1920
gaattatttg	agaaaaatca	gcatattatt	tctccattgc	ttgctgctaa	accaattgaa	1980
tggaatgatt	ccaatacgtg	aggaaagtaa	attcccataa	aacatatctt	tttgaaaaat	2040
at ttggggga	atgtgttatt	cgtggagatg	ttgcagagtt	aaaaaaagct	ttttcaaatt	2100
atatgaataa	aggaactgct	ggaaaattat	ctaataattc	aatgcgacat	aagaaaaaca	2160
ttttgat	ttc agtcatcact	atgactactc	gttcggctat	acagggagga	ttacctgaag	2220
aagaagcttt	tttgatgagt	gatttatata	ttcaagagct	tgaagaatta	acggaattag	2280
aagaaattag	aacgcttgcc	tataatgtga	tgatcgattt	tgcagataaa	gtgaaacagc	2340
atcgatattg	tcaggtttct	tataaaatat	tatcttgtca	aaagtatatt	gttaatcatt	2400
tatacgaaaa	actaagtgtg	agtgaatttg	cagaagagct	acacatgaat	at tttcttatt	2460
tatcttcaca	attcaaaaaa	gagacagggc	aaacaattac	aaactttatt	caggagaagc	2520
gaatagaaga	agctagagaa	ttaatccttt	tctcagacta	tcctttttca	agaatttata	2580
ccttgttgg	tttactgcc	aagtcatttt	ataaaaatat	ttaaaaata	tactggaata	2640
actcccaaaa	agtttcaaga	tcagtatatt	tatcatgcct	ctacatcaat	atatgattga	2700
aattaaaaaa	agacctagaa	tttcaaaatt	gataaaatac	atacctaaaa	tattaattct	2760
gtactattac	gggtggagta	tctactgtat	aatgagggta	taaattatgg	aagaagggag	2820
taaaactaaa	tttattgatg	gttttacgaa	ttaattagga	tat tttttttt	aaaaaccaa	2880
gaaaacgctt	acaaacgtta	aaggagtga	tctaaagatg	gacaaatttg	aaaaatggct	2940
aaataagacc	ttgatgccac	ttgcctcaaa	aatgaataaa	aatcatttca	tttcggcatt	3000
aagtgaagca	tttatgagat	gtatgccctt	aacattaggg	attgcattat	tgacaattat	3060
aggatacttt	ccagttcctg	cctgggtaga	tttcttaaac	tctattggac	tggctcagca	3120
tttttcagca	gttattgggtg	cagttaccag	tgcgctagca	at tttatgtaa	cttataattt	3180
tgcttattct	tatgtaaatc	gtcatgaata	taatggccat	acggccggtt	tattatcaat	3240
cgcaagtttg	ttaatgctaa	tgccacaaat	tattactgtc	cctgtagtaa	aaaacattcc	3300
aaccgaattt	ccgaaatccg	cggtagtga	cagtgtgtca	aatgttgaag	catttcaaac	3360
ggtatacacg	ggtagcacag	gattaattgt	agcaatcata	attggtttta	ttgtttcatt	3420
agtctatata	caattgagca	aaagaaattt	agttattaaa	ttaccagctg	gagttcctcc	3480
aatggttgta	gattcactaa	gtccagcaat	tatttcaatg	gtgattttct	gtttgatgtt	3540
cgggattcgt	gtgggattct	cttatacgcc	attccatgat	at ttttcaatt	tctcaacaca	3600
actaattcaa	gcaccgttga	ctgggtgctgt	ggcaaatcca	tgggttctta	tgggcatctt	3660
tacctttgg	aatttcttat	ggttcttttg	tatccacct	aatttaattg	ggggaatttt	3720
aatccattg	ttattaacaa	tgtcatatgc	taatattgat	gcctatgctg	ccggaaaacc	3780
tgtaccatac	ttacaaatga	tgattgtgtt	tgctgtgggt	gcgaacgcat	ggggcgaag	3840
tggaaatact	tatgggttag	ttatttcaat	gtttacggca	aaatctgaac	gctataaaca	3900

attattaaaa	ttaggtgcaa	ttcctagtat	tttcaatata	agtgaacat	tacttttttg	3960
tcttccaatg	atgttaaata	ctcttttctt	tattcccttg	gttttccaac	cagcaatttt	4020
aggaactgta	gcattgggct	tggcaaagat	attatatatt	acaaatctga	atccaatgac	4080
ggcacttctt	ccttggacga	caccagcacc	tgtgagaatg	gccatttcag	gtggacttcc	4140
atttttgatt	atttttgcaa	tctgtttagt	cttgaatggt	cttatttact	acccattctt	4200
taaggtggcg	tataataaag	ctttagaaga	agaaaaagca	gctgttgaat	tagaggggtc	4260
agaaactgcc	tgatggatat	tttttataaa	tctggtttga	acaaattata	ttgacatctc	4320
tttttctata	ctgataattc	tgagagggtta	ttttgggaaa	tactattgaa	ccatatcgag	4380
gtggtgtggt	ataatgaagg	gaattaaaaa	agataggaaa	atttcatgaa	aaaaaagatt	4440
atctcagcta	ttttaatgtc	tacagtcata	ctttctgctg	cagccccgtt	gtcaggtggt	4500
tacgcctcag	ctgggtcaagg	tactcaatca	gaaaactcat	gtactcactt	tccaggtaac	4560
ttgccaaaaca	tgcttcgtga	tttgctgat	gctttttcac	gtgttaaaac	tttttttcaa	4620
atgaaagata	aacttgataa	cttgcttttg	aaagaatcac	ttttggaaga	ttttaaagggt	4680
taccttggtt	gtcaagcttt	gtcagaaatg	atccaatttt	accttgaaga	agttatgcca	4740
caagctgaaa	accaagatcc	agatatcaaa	gtcacggtta	actcattggg	tgaaaacctt	4800
aaaactttgc	gtcttcgttt	gcgtcgttgt	caccgttttc	ttccatgtga	aaacaaatca	4860
aaagctgttg	aacaagttaa	aaacgctttt	aacaaattgc	aagaaaaagg	tatctacaaa	4920
gctatgtcag	aatttgatat	ctttatcaac	tacatcgaag	cttacatgac	tatgaaaatc	4980
cgtaactaac	tagaattaat	ctataagtta	ctgacaaaaa	tgtcagtaac	tttttttgtg	5040
ggaaaaatgt	atttttatga	cgttaaagaa	tctgtcagta	gaagtctgaa	attcgtttta	5100
aaatcgacta	gaataggctt	taacgacaag	atgtttttaa	gagtacgctc	taaatgtatt	5160
tttgtatttt	tgtttgatta	cgaagttaa	atttaattga	caaatgtttt	aaaatgagta	5220
taataggact	tgtaaccgat	tttattttta	taaaggagaa	agaaagatga	acaaactttt	5280
acttggaaaca	gccttttatag	gggctagctt	actgattggt	gggggtgctc	atgcagatca	5340
aatgtttatc	gtttgtataa	tcataatact	ggtgagcact	ctatacaact	agtgggacac	5400
caaaagaatg	ctaataag	tgcgggttg	acttatgaag	gtgtcggttg	gatcgacca	5460
acaacaagtt	caagcccagt	ttaccgtgtg	tacaatccaa	atgcattatt	acacaaaaag	5520
caagtatgaa	gcccaaagtt	tagtaaataa	gggttgga	tggaataata	acggaaaggc	5580
ggtcttctat	tctggagggt	ctcaagccgt	atatgtcgct	tataatccca	atgcacaatc	5640
tggcgctcac	aattacacgg	aaagtagctt	tgagcaaaat	agcttattga	atactggttg	5700
gaaatatggg	gcagtagctt	ggtacgggat	tggagtaaaa	aacgaaatgt	taaacattgc	5760
tcaaattggt	agtggtaatt	tttctagtat	tgttggaact	tggaaagata	cttctggaaa	5820
tatgcttgaa	attaatgcaa	tgggaaatct	tactttaata	tggaaagggg	caaagaatca	5880
aacctttgaa	cttggcgag	gtcaacaatt	taatggaact	gcagatattg	ccttaaaaaa	5940

```

tggagagatt tcccctggta gtccacttaa catTTTTgtt gtaccaacag aagttgcttt 6000
ccctaataat aaaaaagtag acgattcaac tgggcaacaa cgaatTTTTg tgaattattc 6060
tgggtacaagc cctcaaatgg cgaatagtat ggcagcggg gctTTTTtta gagttattcc 6120
atgattatat taaagttaga attgaataaa atgtattatt aaaaagataa tattatatca 6180
cgacaaggcg acatctatca actttaccac tgggtatggaa gtgaccatta ttacatcagg 6240
aaacgctaaa acggttgttt ttacacccgt aaaataaata ataaaataat gtgaaattac 6300
tgacagcatt ttgtcagtaa ttttttttat caaaatcaca caaaaatgtt cgttgacgaa 6360
caaaaaaac tatgttataa taattcgtat gogaactaaa aaagaagcga ttggccgact 6420
tttaaaagta gccagcaacc aaatgtctcg agaatttgat aattttgcag ctcaacttga 6480
tttgacaggt cagcaaatgt caattttaga ttttcttga aatcaaagcg aagaagggtc 6540
aggaaaagaa attagtcaga cgatgattga attagaattt aatatccgac gttcaacaac 6600
gacggaaatt ttacagcgca tggaaaagcg gcttttaatt aatcgaagaa caagcctgac 6660
cgatgcccgc caaaaatcag ttgaattaac tgaagaaggg aaaagatatt tacctgaaat 6720
cagggttat atccaagcac ataataaaaa agc 6753

```

<210> 21

<211> 6904

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> misc_feature

<223> Thy15

<400> 21

```

attaacagcc ttttgagcag ctagctcatt attttgaaat aaatcataaa tttctttccc 60
actatctgat ttatgattgc tagcatattt gttgtataat cgaacgagtc catTTTgaac 120
agatccatat agattgagtg aactataaaa tacatctata tcatagttga gtttgttcac 180
aatcatgaga ccaaatcttc cagcatttgc tgtagaacca cgataaagct gtttatttag 240
caaaatggca cctccgacac ctgtacctaa agtcatgcaa ataaaatttt ggctttcttg 300
tccattccct agccaaagtt cagctagacc tgcacaattg gcatcatttt caacataaac 360
cggaagattt aaatgttttt gtagttctgt cccaatgga tagccataaa gatcagttag 420
agctcctgcc agtaataatg ttcccttttt gtcagaagtt ccgggaacac ttacaccaat 480
tgcagatact gaatgatgag cttttaactg atgaatattt gtgagcaagc tatccataat 540
tttttctttt tttaatgggg ttggaacttg taaatgttgt atgatcgttc catcactagt 600
tacaagacca aattttataa atgtaccacc gatatcaatt cctattgaat aatgcatctt 660
ttattacctc tttctctaatt ttgttttagt atagcaaaat caaaaaatta attatggtat 720
gcattataga tatgttgtat aattttcaca aaaacggaga aaactatgaa aacaatagaa 780
cagctcatga tagattcagc agatttaatg tcagatttta ttcaattgac aatttttata 840

```

ttccgcaagg	aggattttca	acttttttat	aggagtgatg	agaagagca	agctttttca	900
aggtaatgac	tccaacttat	tgatagtgtt	ttatgttcag	ataatgcccg	atgactttgt	960
catgcagctc	caccgatttt	gagaacgaca	gcgacttccg	tcccagccgt	gccaggtgct	1020
gcctcagatt	caggttatgc	cgtcaattc	gctgcgtata	tcgcttgctg	attacgtgca	1080
gctttccctt	caggcgggat	tcatacagcg	gccagccatc	cgtcatccat	atcaccacgt	1140
caaaggggta	cagcaggctc	ataagacgcc	ccagcgtcgc	catagtgcgt	tcaccgaata	1200
cgtgcgcaac	aaccgtcttc	cggagactgt	catacgcgta	aaacagccag	cgctggcgcg	1260
atttagcccc	gacatagccc	cactgttcgt	ccatttccgc	gcagacgatg	acgtcactgc	1320
ccggctgtat	gcgcgaggtt	accgactgcg	gcctgagttt	tttaagtga	gtaaaaatcg	1380
gttgaggcca	acgcccataa	tgcgggctgt	tgcccggcat	ccaacgccat	tcattggccat	1440
atcaatgatt	ttctgggtgcg	taccgggttg	agaagcggtg	taagtgaact	gcagttgcca	1500
tgttttacgg	cagtgcagagc	agagatagcg	ctgatgtccg	gcggtgcttt	tgccgttacg	1560
caccaccccc	tcagtagctg	aacaggaggg	acagctgata	gaaacagaag	ccactggagc	1620
acctcaaaaa	caccatcata	cactaaatca	gtaagttggc	agcatcacc	tttttcaaaa	1680
gaaatcatcg	ctcattttatc	tcagttgccc	ttgaaggaag	aggtgaattt	attttatatg	1740
cctaagataa	aaggatatat	tacttttttt	tctgtatttg	gtaaagagga	gtatcttcta	1800
cttatttttta	aaggacaaga	aaaacttgca	aataatcctt	tccccgttga	agtaaaacaa	1860
ttattaaaaa	gtgggtatttt	actctatcaa	atgatttttc	aagaaaaatt	agattatgaa	1920
gaattatttg	agaaaaatca	gcataattat	tctccattgc	ttgctgctaa	accaattgaa	1980
tggaatgatt	ccaatacgtg	aggaaagtaa	attcccataa	aacatatcct	tttgaaaaat	2040
atttggggga	atgtgttatt	cgtggagatg	ttgcagagtt	aaaaaaagct	ttttcaaatt	2100
atatgaataa	aggaactgct	ggaaaattat	ctaataattc	aatgcgacat	aagaaaaaca	2160
ttttgatttc	agtcatcact	atgactactc	gttcggctat	acagggagga	ttacctgaag	2220
aagaagcttt	tttgatgagt	gatttatata	ttcaagagct	tgaagaatta	acggaattag	2280
aagaaattag	aacgcttgcc	tataatgtga	tgatcgattt	tcagataaaa	gtgaaacagc	2340
atcgatattg	tcaggttttct	tataaaatat	tatcttgtca	aaagtatatt	gttaatcatt	2400
tatacgaaaa	actaagtgtg	agtgaatttg	cagaagagct	acacatgaat	atttcttatt	2460
tatcttcaca	attcaaaaaa	gagacagggc	aaacaattac	aaactttatt	caggagaagc	2520
gaatagaaga	agctagagaa	ttaatccttt	tctcagacta	tcctttttca	agaatttata	2580
ccttgttggt	tttactgcca	aagtcatttt	ataaaaatat	ttaaaaaata	tactggaata	2640
actcccaaaa	agtttcaaga	tcagtatatt	tatcatgcct	ctacatcaat	atatgattga	2700
aattaaaaaa	agacctagaa	tttcaaaatt	gataaaatac	atacctaaaa	tattaattct	2760
gtactattac	gggtggagta	tctactgtat	aatgagggta	taaattatgg	aagaaggag	2820
taaaactaaa	tttattgatg	gttttacgaa	ttaattagga	tatttttttt	aaaaaccaa	2880

gaaaacgctt	acaaacgtta	aaggagtga	tctaaagatg	gacaaatttg	aaaaatggct	2940
aaataagacc	ttgatgccac	ttgcctcaaa	aatgaataaa	aatcatttca	tttcggcatt	3000
aagtgaagca	tttatgagat	gtatgccctt	aacattaggg	attgcattat	tgacaattat	3060
aggatacttt	ccagttcctg	cctgggtaga	tttcttaaac	tctattggac	tggtctagca	3120
tttttcagca	gttattgggtg	cagttaccag	tgcgctagca	atttatgtaa	cttataattt	3180
tgcttattct	tatgtaaata	gtcatgaata	taatggccat	acggccgggt	tattatcaat	3240
cgcaagtttg	ttaatgctaa	tgccacaaat	tattactgtc	cctgtagtaa	aaaacattcc	3300
aaccgaatth	ccgaaatccg	cggtagttga	cagtggtgca	aatggtgaag	catttcaaac	3360
ggtatacacg	ggtagcacag	gattaattgt	agcaatcata	attggtttta	ttgtttcatt	3420
agtctatata	caattgagca	aaagaaatth	agttattaaa	ttaccagctg	gagttcctcc	3480
aatggttgta	gattcactaa	gtccagcaat	tatttcaatg	gtgattttct	gtttgatgtt	3540
cgggattcgt	gtgggattct	cttatacgcc	attccatgat	attttcaatt	tctcaacaca	3600
actaattcaa	gcaccgttga	ctgggtgctgt	ggcaaatcca	tggtttctta	tgggcatctt	3660
tacctttggg	aatttcttat	ggttctttgg	tatccaccct	aatttaattg	ggggaattht	3720
aatccattg	ttattaacaa	tgtcatatgc	taatattgat	gcctatgctg	ccggaaaacc	3780
tgtaccatac	ttacaaatga	tgattgtgtt	tgctgtgggt	gcgaacgcat	ggggcggaag	3840
tggaataact	tatgggttag	ttatttcaat	gtttacggca	aaatctgaac	gctataaaca	3900
attattaaaa	ttaggtgcaa	ttcctagtat	tttcaatata	agtgaaccat	tactttttgg	3960
tcttccaatg	atgttaaata	ctcttttctt	tattcctttg	gttttccaac	cagcaattht	4020
aggaactgta	gcattgggct	tggcaaagat	attatatatt	acaaatctga	atccaatgac	4080
ggcacttctt	ccttgagcga	caccagcacc	tgtgagaatg	gccatttcag	gtggacttcc	4140
atttttgatt	atttttgcaa	tctgtttagt	cttgaatgtt	cttatttact	accatttctt	4200
taaggtggcg	tataataaag	ctttagaaga	agaaaaagca	gctgttgaat	tagagggttc	4260
agaaactgcc	tgatggatat	tttttataaa	tctggtttga	acaaattata	ttgacatctc	4320
tttttctatc	ctgataatth	tgagagggtta	ttttgggaaa	tactagatta	agtcacttta	4380
cctcttttat	tagttttttc	ttataatcta	atgataacat	ttttataatt	aatctataaa	4440
ccatatccct	ctttggaatc	aaaatttatt	atctactcct	ttgtagatat	gttataatac	4500
aagtatcaga	tctgggagac	cacaacgggt	tcccactaga	aataatthtg	tttaacttta	4560
gaaaggagat	atacgcatga	aaaaaaagat	tatctcagct	attttaaagt	ctacagtcac	4620
actttctgct	gcagcccggt	tgtcagggtgt	ttacgcctca	gctgggtcaag	gtactcaatc	4680
agaaaactca	tgtactcact	ttccaggtaa	cttgccaaac	atgcttcgtg	atttgcttga	4740
tgctttttca	cgtgttaaaa	ctttttttca	aatgaaagat	caacttgata	acttgcttht	4800
gaaagaatca	cttttggaag	atttttaaagg	ttaccttggg	tgtcaagctt	tgtcagaaat	4860
gatccaatth	taccttgaag	aagttatgcc	acaagctgaa	aaccaagatc	cagatatcaa	4920

```

agctcacggt aactcattgg gtgaaaacct taaaactttg cgtcttcggt tgcgtcggtg 4980
tcaccggttt cttccatgtg aaaacaaatc aaaagctggt gaacaagtta aaaacgcttt 5040
taacaaattg caagaaaaag gtatctacaa agctatgtca gaatttgata tctttatcaa 5100
ctacatcgaa gcttacatga ctatgaaaat ccgtaactaa ctagaattaa tctataagtt 5160
actgacaaaa ctgtcagtaa ctttttttgt gggaaaaatg tttttttatg accgtaaaga 5220
atctgtcagt agaagctga aattcgttta aaaatcgact agaataggct ttaacgacaa 5280
gatgttttaa agagtacgct ctaaatgtat ttttgtat ttgtttgatt acgaagttta 5340
aatttaattg acaaatgttt taaaatgagt ataataggac ttgtaaccga ttttattttt 5400
ataaaggaga aagaaagatg aacaaacttt tacttggaac agcctttata ggggctagct 5460
tactgattgg tgggggtgct catgcagatc aaatgtttat cgtttgtata atcataatac 5520
tggtagagac tctatacaac tagtgggaca ccaaaagaat gctaatagtg gtgcgggttg 5580
gacttatgaa ggtgtcgggt ggatcgacc aacaacaagt tcaagcccag tttaccgtgt 5640
gtacaatcca aatgcattat tacacaaaaa gcaagtatga agcccaaagt ttagtaaata 5700
aggggtggaa atgggataat aacggaaagg cggtcttcta ttctggaggt tctcaagccg 5760
tatatgtgc ttataatccc aatgcacaat ctggcgctca caattacacg gaaagtagct 5820
ttgagcaaaa tagcttattg aatactgggt ggaatatagg ggcagtagct tggtagggga 5880
ttggagtaaa aaacgaaatg ttaaacttg ctcaaattgt tagtggtaat tttctagta 5940
ttgttggaac ttggaagat acttctggaa atatgcttga aattaatgca atgggaaatc 6000
ttactttaat atggaaagg gcaaagaatc aaacctttga acttggcgca ggtcaacaat 6060
ttaatggaac tgcagatatt gccttaaaaa atggagagat ttccctgggt agtccactta 6120
acatttttgt tgtaccaaca gaagtgtct tcctaataa taataaagta gacgattcaa 6180
ctgggcaaca acgaattttt gtgaattatt ctggtacaag cctcaaagt gcgaatagta 6240
tggcagcggg ggcttttttt agagtattc catgattata ttaaagttag aattgaataa 6300
aatgtattat taataagata atattatatc acgacaaggc gacatctatc aactttacca 6360
ctggtatgga agtgaccatt attacatcag gaaacgctaa aacggttggt ttacacccg 6420
taaaaataat aataaataa tgtgaaatta ctgacagcat tttgtcagta atttttttta 6480
tcaaatcac acaaaaatgt tcgttgacga acaaaaaaaa ctatgttata ataattcgta 6540
tgcaactaa aaaagaagcg attggccgac ttttaaaagt agccagcaac caaatgtctc 6600
gagaatttga taattttgca gctcaacttg atttgacagg tcagcaaagt tcaattttag 6660
attttcttgg aatcaaagc gaagaagggt caggaaaaga aattagtcag acgatgattg 6720
aattagaatt taatatccga cgttcaaca cgacggaaat ttacagcgc atggaaaagc 6780
ggcttttaat taatgaaga acaagcctga ccatgccc ccaaaaatca gttgaattaa 6840
ctgaagaagg gaaaagatat ttacctgaaa tcagggtta tatccaagca cataataaaa 6900
aagc 6904

```

<210> 22

<211> 6964

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> misc_feature

<223> Thy16

<400> 22

attaacagcc ttttgagcag ctagctcatt attttgaaat aaatcataaa tttctttccc	60
actatctgat ttatgattgc tagcatattt gttgtataat cgaacgagtc ctttttgaac	120
agatccatat agattgagtg aactataaaa tacatctata tcatagttga gtttgttcac	180
aatcatgaga ccaaattctc cagcatttcg tgtagaacca cgataaagct gtttatttag	240
caaaatggca cctccgacac ctgtacctaa agtcatgcaa ataaaatttt ggctttcttg	300
tccattccct agccaaagt cagctagacc tgcacaattg gcatcatttt caacataaac	360
cggaagattt aaatgttttt gtagttctgt ccccaatgga tagccataaa gatcagttag	420
agctcctgcc agtaataatg ttcccttttt gtcagaagtt ccgggaacac ttacaccaat	480
tgcagatact gaatgatgag cttttaactg atgaatattt gtgagcaagc tatccataat	540
tttttctttt tttaatgggg ttggaacttg taaatgttgt atgatcggtc catcactagt	600
tacaagacca aattttataa atgtaccacc gatatcaatt cctattgaat aatgcatctt	660
ttattacctc tttctctaatt ttgttttagt atagcaaaat caaaaaatta attatgggat	720
gcattataga tatgttgat aattttcaca aaaacggaga aaactatgaa aacaatagaa	780
cagctcatga tagattcagc agatttaatg tcagatttta ttcaattgac aatttttata	840
ttccgcaagg aggattttca acttttttat aggagtgatg aagaagagca agctttttca	900
aggtaatgac tccaacttat tgatagtgtt ttatgttcag ataatgccg atgactttgt	960
catgcagctc caccgatttt gagaacgaca gcgacttccg tcccagccgt gccaggtgct	1020
gcctcagatt caggttatgc cgctcaattc gctgcgtata tcgcttgctg attacgtgca	1080
gctttccctt caggcgggat tcatacagcg gccagccatc cgtcatccat atcaccacgt	1140
caaaggtga cagcaggctc ataagacgcc ccagcgtcgc catagtgcgt tcaccgaata	1200
cgtgcgcaac aaccgtcttc cggagactgt catacgcgta aaacagccag cgctggcgcg	1260
atthagcccc gacatagccc cactgttcgt ccatttccgc gcagacgatg acgtcactgc	1320
ccggctgtat gcgcgaggtt accgactgcg gcctgagttt ttttaagtgc gtaaaatcgt	1380
gttgaggcca acgcccataa tgcgggctgt tgcccgcat ccaacgccat tcattggccat	1440
atcaatgatt ttctgggtgcg taccgggttg agaagcggtg taagtgaact gcagttgcca	1500
tgttttacgg cagtgcagagc agagatagcg ctgatgtccg gcggtgcttt tgccgttacg	1560
caccaccccg tcagtagctg aacaggaggg acagctgata gaaacagaag ccactggagc	1620
acctcaaaaa caccatcata cactaaatca gtaagttggc agcatcaccc tttttcaaaa	1680

gaaatcatcg ctcattttatc tcagttgccc ttgaaggaag aggtgaattt attttatatg	1740
cctaagataa aaggatatat tactttttt tctgtatttg gtaaagagga gtatcttcta	1800
cttattttta aaggacaaga aaaacttgca aataatcctt tccccgttga agtaaaacaa	1860
ttattaataaa gtggtatttt actctatcaa atgatttttc aagaaaaatt agattatgaa	1920
gaattatttg agaaaaatca gcatattatt tctccattgc ttgctgctaa accaattgaa	1980
tggaatgatt ccaatacgtg aggaaagtaa attcccataa aacatatcct tttgaaaaat	2040
atttggggga atgtgttatt cgtggagatg ttgcagagtt aaaaaagct ttttcaaatt	2100
atatgaataa aggaactgct ggaaaattat ctaataattc aatgcgacat aagaaaaaca	2160
ttttgatttc agtcatcact atgactactc gttcggctat acagggagga ttacctgaag	2220
aagaagcttt tttgatgagt gatttatata ttcaagagct tgaagaatta acggaattag	2280
aagaaattag aacgcttgcc tataatgtga tgatcgattt tgcagataaa gtgaaacagc	2340
atcgatattg tcaggtttct tataaaatat tatcttgtca aaagtatat gttaatcatt	2400
tatacgaata actaagtgtg agtgaaattg cagaagagct acacatgaat atttcttatt	2460
tatcttcaca attcaaaaa gagacagggc aaacaattac aaactttatt caggagaagc	2520
gaatagaaga agctagagaa ttaatccttt tctcagacta tcctttttca agaatttata	2580
ccttgttggt tttactgcc aagtcatttt ataaaaatat ttaaaaaata tactggaata	2640
actccaaaa agtttcaaga tcagtatatt tatcatgcct ctacatcaat atatgattga	2700
aattaaaaaa agacctagaa tttcaaaatt gataaaatac atacctaaaa tattaattct	2760
gtactattac gggtaggagta tctactgtat aatgagggtg taaattatgg aagaaggag	2820
taaaactaaa tttattgatg gttttacgaa ttaattagga tatttttttt aaaaaccaa	2880
gaaaacgctt acaaacgtta aaggagtga tctaaagatg gacaaatttg aaaaatggct	2940
aaataagacc ttgatgccac ttgcctcaaa aatgaataaa aatcatttca tttcggcatt	3000
aagtgaagca tttatgagat gtatgccctt aacattaggg attgcattat tgacaattat	3060
aggatacttt ccagttcctg cctgggtaga tttcttaaac tctattggac tggctcagca	3120
tttttcagca gttattggtg cagttaccag tgcgctagca atttatgtaa cttataattt	3180
tgcttattct tatgtaaact gtcatgaata taatggccat acggccggtt tattatcaat	3240
cgcaagtttg ttaatgctaa tgccacaaat tattactgtc cctgtagtaa aaaacattcc	3300
aaccgaattt ccgaaatccg cggtagttga cagtgtgtca aatggtgaag catttcaaac	3360
ggtatacacg ggtagcacag gattaattgt agcaatcata attggtttta ttgtttcatt	3420
agtctatata caattgagca aaagaaattt agttattaaa ttaccagctg gagttcctcc	3480
aatggttgta gattcactaa gtccagcaat tatttcaatg gtgattttct gtttgatgtt	3540
cgggattcgt gtgggattct cttatacgcc attccatgat attttcaatt tctcaacaca	3600
actaattcaa gcaccgttga ctgggtgctgt ggcaaatcca tgggttctta tgggcatctt	3660
tacctttggt aatttcttat ggttcttttg tatccaccct aatttaattg ggggaatttt	3720

.aaatccattg	ttattaacaa	tgtcatatgc	taatattgat	gcctatgctg	ccggaaaacc	3780
tgtaccatac	ttacaaatga	tgatttgtgt	tgtgtgggt	gcgaacgcat	ggggcggaag	3840
tggaataact	tatgggttag	ttatttcaat	gtttacggca	aaatctgaac	gctataaaca	3900
attattaaaa	ttagggtgca	ttcctagtat	tttcaatatc	agtgaaccat	tacttttttg	3960
tcttccaatg	atgttaaatac	ctcttttctt	tattcctttg	gttttccaac	cagcaatttt	4020
aggaactgta	gcattgggct	tggcaaagat	attatatatt	acaaatctga	atccaatgac	4080
ggcacttctt	ccttggacga	caccagcacc	tgtgagaatg	gccatttcag	gtggacttcc	4140
atttttgatt	atttttgcaa	tctgtttagt	cttgaatgtt	cttatttact	acccattctt	4200
taaggtggcg	tataataaag	ctttagaaga	agaaaaagca	gctgttgaat	tagagggttc	4260
agaaactgcc	tgatggatat	tttttataaa	tctggtttga	acaaattata	ttgacatctc	4320
tttttctatc	ctgataaatc	tgagagggtta	ttttgggaaa	tactattgaa	ccatatcgag	4380
gtggtgtggt	ataatgaagg	gaattaaaaa	agataggaaa	atttcgatta	agtcactcta	4440
cctcttttat	tagttttttc	ttataatcta	atgataacat	ttttataatt	aatctataaa	4500
ccatatccct	ctttggaatc	aaaatttatt	atctactcct	ttgtagatat	gttataatac	4560
aagtatcaga	tctgggagac	cacaacggtt	tcccactaga	aataattttg	tttaacttta	4620
gaaaggagat	atacgcatga	aaaaaaagat	tatctcagct	attttaatgt	ctacagtcac	4680
actttctgct	gcagccccgt	tgtcagggtg	ttacgcctca	gctggtcaag	gtactcaatc	4740
agaaaactca	tgtactcact	ttccaggtaa	cttgccaaac	atgcttcgtg	atttgcgatga	4800
tgctttttca	cgtgttaaaa	ctttttttca	aatgaaagat	caacttgata	acttgctttt	4860
gaaagaatca	cttttggaag	attttaaagg	ttaccttggt	tgtcaagctt	tgtcagaaat	4920
gatccaattt	taccttgaag	aagttatgcc	acaagctgaa	aaccaagatc	cagatatcaa	4980
agctcacggt	aactcattgg	gtgaaaacct	taaaactttg	cgtcttcggt	tgcgtcgttg	5040
tcaccgtttt	cttccatgtg	aaaacaaatc	aaaagctggt	gaacaagtta	aaaacgcttt	5100
taacaaattg	caagaaaaag	gtatctacaa	agctatgtca	gaatttgata	tctttatcaa	5160
ctacatcgaa	gcttacatga	ctatgaaaat	ccgtaactaa	ctagaattaa	tctataagtt	5220
actgacaaaa	ctgtcagtaa	ctttttttgt	gggaaaaatg	tatttttatg	accgtaaaga	5280
atctgtcagt	agaagtctga	aattcgttta	aaaatcgact	agaataggct	ttaacgacaa	5340
gatgttttaa	agagtacgct	ctaaatgtat	ttttgtattt	ttgtttgatt	acgaagttta	5400
aatttaattg	acaaatgttt	taaaatgagt	ataataggac	ttgtaaccga	ttttattttt	5460
ataaaggaga	aagaaagatg	aacaaacttt	tacttggaac	agcctttata	ggggctagct	5520
tactgattgg	tgggggtgct	catgcagatc	aatgttttat	cgtttgtata	atcataatac	5580
tggtagcac	tctatacaac	tagtgggaca	ccaaaagaat	gctaattgt	gtgcgggttg	5640
gacttatgaa	ggtgtcgggt	ggatcgcacc	aacaacaagt	tcaagcccag	tttaccgtgt	5700
gtacaatcca	aatgcattat	tacacaaaaa	gcaagtatga	agcccaaagt	ttagtaaata	5760

```

agggttggaa atgggataat aacggaaagg cggctcttcta ttctggaggt tctcaagccg 5820
tatatgtcgc ttataatccc aatgcacaat ctggcgctca caattacacg gaaagtagct 5880
ttgagcaaaa tagcttattg aatactgggt ggaaatatgg ggcagtagct tggtagggga 5940
ttggagtaaa aaacgaaatg ttaaacattg ctcaaattgt tagtggtaat ttttctagta 6000
ttgttggaa ttggaaagat acttctggaa atatgcttga aattaatgca atgggaaatc 6060
ttactttaat atggaaaggg gcaaagaatc aaacctttga acttggcgca ggtcaacaat 6120
ttaatggaa tgcagatatt gccttaaaaa atggagagat ttccctgggt agtccactta 6180
acatttttgt tgtaccaaca gaagttgctt tccctaataa taaaaaagta gacgattcaa 6240
ctgggcaaca acgaattttt gtgaattatt ctggtacaag ccctcaaagtg gcgaatagta 6300
tggcagcggg ggcttttttt agagttattc catgattata ttaaagttag aattgaataa 6360
aatgtattat taaaaagata atattatatt acgacaaggc gacatctatc aactttacca 6420
ctggtatgga agtgaccatt attacatcag gaaacgctaa aacggttggt tttacaccg 6480
taaaataaat aataaaataa tgtgaaatta ctgacagcat tttgtcagta atttttttta 6540
tcaaaatcac acaaaaatgt tcgttgacga acaaaaaaaaa ctatgttata ataattcgta 6600
tgcaactaa aaaagaagcg attggccgac ttttaaaagt agccagcaac caaatgtctc 6660
gagaatttga taatttttga gctcaacttg atttgacagg tcagcaaatg tcaatttttag 6720
attttcttgg aaatcaaagc gaagaagggt caggaaaaga aattagtcag acgatgattg 6780
aattagaatt taatatccga cgttcaacaa cgacggaaat tttacagcgc atggaaaagc 6840
ggctttttaa taatcgaaga acaagcctga ccgatgcccg ccaaaaatca gttgaattaa 6900
ctgaagaagg gaaaagatat ttacctgaaa tcagggttta tatccaagca cataataaaa 6960
aagc 6964

```

<210> 23

<211> 4998

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pOThy11

<400> 23

```

aatttcattg attaatgcat cttacctctt ttattagttt tttcttataa tctaatgata 60
acatttttat aattaatcta taaaccatat ccctctttgg aatcaaaatt tattatctac 120
tcctttgtag atatgttata atacaagtat cagatctggg agaccacaac ggtttccac 180
tagaaataat tttgtttaac tttagaaagg agatatacgc atgaaaaaaaa agattatctc 240
agctatttta atgtctacag tcatactttc tgctgcagcc ccgttgtcag gtgtttacgc 300
ctcagctggt caaggtactc aatcagaaaa ctcatgtact cactttccag gtaacttgcc 360
aaacatgctt cgtgatttgc gtgatgcttt ttcacgtgtt aaaacttttt ttcaaatgaa 420
agatcaactt gataacttgc ttttgaaaga atcacttttg gaagatttta aaggttacct 480

```

tggttgtaa gctttgtcag aaatgatcca attttacctt gaagaagtta tgccacaagc	540
tgaaaaccaa gatccagata tcaaagctca cgttaactca ttgggtgaaa accttaaaac	600
tttgcgcttt cgtttgcgtc gttgtcacccg ttttcttcca tgtgaaaaca aatcaaaaagc	660
tgttgaacaa gttaaaaaacg cttttaacaa attgcaagaa aaaggatatct acaaagctat	720
gtcagaattt gatattcttta tcaactacat cgaagcttac atgactatga aaatccgtaa	780
ctaactagaa ttaattctata agttactgac aaaactgtca gtaacttttt ttgtgggaaa	840
aatgtatttt tatgaccgta aagaatctgt cagtagaagt ctgaaattcg tttaaaaatc	900
gactagaata ggctttaacg acaagatggt ttaaagagta cgctctaaat gtatttttgt	960
atttttgttt gattacgaag tttaaattta attgacaaat gttttaaaat gagtataata	1020
ggacttgtaa ccgattttat tttataaag gagaaagaaa gatgaacaaa cttttacttg	1080
gaacagcctt tataggggct agcttactga ttgggtgggg tgctcatgca gatcaaatgt	1140
ttatcgtttg tataatcata atactgggtga gcactctata caactagtgg gacacacaaa	1200
gaatgctaata gtaagtgcgg gttggactta tgaagggtgc ggttgatcg caccaacaac	1260
aagttcaagc ccagtttacc gtgtgtacaa tccaaatgca ttattacaca aaaagcaagt	1320
atgaagccca aagtttagta aataagggtt ggaaatggga taataacgga aaggcggctt	1380
tctattctgg aggttctcaa gccgtatatg tcgcttataa tcccaatgca caatctggcg	1440
ctcacaatta cacggaaagt agctttgagc aaaatagctt attgaatact ggttggaat	1500
atggggcagt agcttggtac gggattggag taaaaacga aatgttaaac attgctcaaa	1560
ttgttagtgg taatttttct agtattgttg gaacttgga agatacttct ggaaatatgc	1620
ttgaaattaa tgcaatggga aatcttactt taatatggaa aggggcaaag aatcaaacct	1680
ttgaacttgg cgcaggtcaa caatttaatg gaactgcaga tattgcctta aaaaatggag	1740
agatttcccc tggtagtcca cttaacattt ttgttgtacc aacagaagtg aattcactgg	1800
ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt taccacactt aatcgcttg	1860
cagcacatcc ccttttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgacc gatcgccctt	1920
cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggcgcctgat gcggtatttt ctcttacgc	1980
atctgtgcgg tatttcacac cgcataatgt gcactagaac tagcgattct gaaatcacca	2040
tttaaaaaac tccaatcaaa taattttata aagttagtgt atcaatttgt aatcataaaa	2100
acaacaataa agctacttaa atatagattt ataaaaaacg ttggcgaaaa cgttggcgat	2160
tcgttggcga ttgaaaaacc ccttaaaccc ttgagccagt tgggatatag cgtttttggc	2220
acaaaaattg gcactcggca cttaatgggg ggtcgtagta cggaagcaaa attcgcttcc	2280
tttcccccca tttttttcca aattccaaat ttttttcaaa aattttccag cgctaccgct	2340
cggcaaaatt gcaagcaatt tttaaaatca aacccatgag ggaatttcac tccctcatac	2400
tcccttgagc ctctccaac cgaaatagaa gggcgctgcg cttattattt cattcagtca	2460
tcggctttca taatctaaca gacaacatct tcgctgcaaa gccacgctac gctcaagggc	2520

```

ttttacgcta cgataacgcc tgttttaacg attatgccga taactaaacg aaataaacgc 2580
taaaacgtct cagaaacgat tttgagacgt ttttaataaaa aatcgctagt ccgaggcctc 2640
gacccgattc acaaaaaata ggcacacgaa aaacaagtta agggatgcag tttatgcac 2700
ccttaactta cttattaaat aatttatagc tattgaaaag agataagaat tgttcaaagc 2760
taatatgtgt taaatcgta attcctgcat gttttaagga attgttaaatt tgattttttg 2820
taaataatttt cttgtattct ttgttaaccc atttcataac gaaataatta tacttttggt 2880
tatctttgtg tgatattctt gatttttttc tacttaattct gataagtgcg ctattcactt 2940
taggtttagg atgaaaatat tctcttgga ccatacttaa tatagaaata tcaacttctg 3000
ccattaaaag taatgccaat gagcgttttg tatttaataa tcttttagca aaccggtatt 3060
ccacgattaa ataaatctca ttagctatac tatcaaaaac aattttgcgt attatatccg 3120
tacttatgtt ataaggtata ttaccatata ttttatagga ttggttttta ggaaatttaa 3180
actgcaatat atccttggtt aaaacttgga aattatcggt atcaacaagt ttattttctg 3240
tagttttgca taatttatgg tctatttcaa tggcagttac gaaattacac ctctttacta 3300
attcaaggtt aaaatggcct tttcctgagc cgatttcaaa gatattatca tgttcattta 3360
atcttatatt tgtcattatt ttatctatat tatgttttga agtaataaag ttttgactgt 3420
gttttatatt tttctcgctt attataaccc tctttaattt ggttatatga attttgctta 3480
ttaacgattc attataacca cttatttttt gtttggttga taatgaactg tgctgattac 3540
aaaaatacta aaaatgccca tatttttttc tccttataaa attagtataa ttatagcacg 3600
ggtcgagatc catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg 3660
cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga 3720
gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgctt tgcccgattc 3780
attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa 3840
ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac ccaggcttt acactttatg cttccggctc 3900
gtatgttggt tggaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg 3960
attacgcaa gcttgcattc ctgcaggctg actctagagg atcctatata caattgagca 4020
aaagaaattt agttattaaa ttaccagctg gagttcctcc aatggttgta gattcactaa 4080
gtccagcaat tatttcaatg gtgattttct gtttgatgtt cgggattcgt gtgggattct 4140
cttatacgcc attccatgat attttcaatt tctcaacaca actaattcaa gcaccgttga 4200
ctgggtgctgt ggcaaatacc tgggttctta tgggcattct tacctttggt aatttcttat 4260
ggttcttttg tatccacctt aatttaattg ggggaatttt aaatccattg ttattaacaa 4320
tgtcatatgc taatatgtat gcctatgctg ccggaacc tgtaccatac ttacaaatga 4380
tgattgtgtt tgctgtgggt gcgaacgcat gggcggaag tggaaatact tatgggttag 4440
ttatttcaat gtttacggca aaatctgaac gctataaaca attattaaaa ttaggtgcaa 4500
ttcctagtat tttcaatatc agtgaacat tactttttgg tcttccaatg atgttaaate 4560

```

```

ctcttttctt tattcctttg gttttccaac cagcaatttt aggaactgta gcattgggct 4620
tggcaaagat attatatatt acaaactctga atccaatgac ggcacttctt ccttggacga 4680
caccagcacc tgtgagaatg gccatttcag gtggacttcc atttttgatt atttttgcaa 4740
tctgtttagt cttgaatggt cttatttact acccattctt taagggtggcg tataataaag 4800
ctttagaaga agaaaaagca gctgttgaat tagaggggtc agaaactgcc tgatggatat 4860
tttttataaa tctgggtttga acaaattata ttgacatctc tttttctatc ctgataattc 4920
tgagaggtta ttttgggaaa tactattgaa ccatatcgag gtgtgtggta taatgaaggg 4980
aattaaaaaa gataggaa 4998

```

<210> 24

<211> 4784

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pOThy12

<400> 24

```

gggttcagaa actgcctgat ggatattttt tataaatctg gtttgaacaa attatatatga 60
catctctttt tctatcctga taattctgag aggttatttt gggaaatact attgaaccat 120
atcgaggtgt gtggtataat gaaggaatt aaaaaagata ggaaaatttc atgaaaaaaa 180
agattatctc agctatttta atgtctacag tcatactttc tgetgcagcc ccgttgtcag 240
gtgtttacgc ctcagctggt caaggctact aatcagaaaa ctcagtact cactttccag 300
gtaacttgcc aaacatgctt cgtgatttgc gtgatgcttt ttcacgtgtt aaaacttttt 360
ttcaaataaa agatcaactt gataacttgc ttttgaaaga atcacttttg gaagatttta 420
aaggttacct tggttgtcaa gctttgtcag aaatgatcca attttacctt gaagaagtta 480
tgccacaagc tgaaaaacca gatccagata tcaaagctca cgtaactca ttgggtgaaa 540
acottaaaac tttgcgtctt cgtttgcgtc gttgtcaccg ttttcttcca tgtgaaaaca 600
aatcaaaagc tgttgaacaa gttaaaaacg cttttaacaa attgcaagaa aaaggtatct 660
acaaagctat gtcagaatth gatattttta tcaactacat cgaagcttac atgactatga 720
aaatccgtaa ctaactagaa ttaattctata agttactgac aaaactgtca gtaacttttt 780
ttgtgggaaa aatgtatttt tatgaccgta aagaatctgt cagtagaagt ctgaaattcg 840
tttaaaaatc gactagaata ggctttaacg acaagatgtt ttaaagagta cgctctaaat 900
gtatttttgt atttttgttt gattacgaag tttaaattta attgacaaat gttttaaaat 960
gagtataata ggacttgtaa ccgattttat ttttataaag gagaaagaaa gatgaacaaa 1020
cttttacttg gaacagcctt tataggggct agcttactga ttgggtgggg tgctcatgca 1080
gatcaaatgt ttatcgtttg tataatcata atactggtga gcactctata caactagtgg 1140
gacaccaaaa gaatgcta atgtaagtgcg gttggactta tgaagggtgc ggttggatcg 1200
caccaacaac aagttcaagc ccagtttacc gtgtgtacaa tccaaatgca ttattacaca 1260

```

aaaagcaagt atgaagccca aagtttagta aataaggggtt ggaaatggga taataacgga	1320
aaggcgggtct tctattcttg aggttctcaa gccgtatatg tegtattataa tcccaatgca	1380
caatctggcg ctcacaatta cacggaaagt agctttgagc aaaatagctt attgaatact	1440
ggttggaat atggggcagt agcttggtac gggattggag taaaaaacga aatgttaaac	1500
attgctcaaa ttgttagtgg taatttttct agtattgttg gaacttgga agatacttct	1560
ggaaatatgc ttgaaattaa tgcaatggga aatcttactt taatatggaa aggggcaaag	1620
aatcaaacct ttgaacttgg cgcaggtcaa caatttaatg gaactgcaga tattgcctta	1680
aaaaatggag agatttcccc tggtagtcca cttaacattt ttgttgtacc aaçagaagtg	1740
aattcactgg cgcgtgtttt acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt taccacactt	1800
aatgcgcttg cagcacatcc ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgacc	1860
gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggcgcctgat gcggtatttt	1920
ctccttacgc atctgtgcgg tatctcacac cgcataatgg gcactagaac tagcgattct	1980
gaaatcacca tttaaaaaac tccaatcaaa taattttata aagttagtgt atcactttgt	2040
aatcataaaa acaacaataa agctacttaa atatagattt ataaaaaacg ttggcgaaaa	2100
cgttggcgat tegtggcgga ttgaaaaacc ccttaaaccc ttgagccagt tgggtagag	2160
cgtttttggc acaaaaattg gcactcggca cttaatgggg ggtcgtagta cggaagcaaa	2220
attcgcttcc tttccccca tttttttcca aattccaaat ttttttcaa aattttccag	2280
cgctaccgct cggcaaaatt gcaagcaatt tttaaatca aaccatgag ggaatttcat	2340
tccctcatac tcccttgagc ctctccaac cgaatagaa gggcgctcgc cttattattt	2400
cattcagtc tgggttttca taatctaaca gacaacatct tegtgcgaaa gccacgctac	2460
gctcaagggc ttttacgcta cgataacgcc tgttttaacg attatgccga taactaaacg	2520
aaataaacgc taaaacgtct cagaaacgat ttgagacgt ttaataaaa aatcgctagt	2580
ccgaggcctc gaccgattc acaaaaaata ggcacacgaa aaacaagta agggatgcag	2640
tttatgcac ccttaactta cttattaaat aatttatagc tattgaaaag agataagaat	2700
tgttcaaagc taatatgtt taaatcgtca attcctgcat gttttaagga attgttaa	2760
tgattttttg taaatatattt cttgtattct ttgttaacc atttcataac gaaataatta	2820
tacttttgtt tatctttgtg tgatattctt gatTTTTTt tacttaatct gataagtga	2880
ctattcactt taggtttagg atgaaaatat tctcttgga ccatacttaa tatagaaata	2940
tcaacttctg ccattaaaag taatgccaat gagcgtttg tatttaataa tcttttagca	3000
aaccgtatt ccacgattaa ataatctca ttagctatac tatcaaaaac aattttgcgt	3060
atttatccg tacttatgtt ataaggata ttaccatata ttttatagga ttggttttta	3120
ggaaatttaa actgcaatat atccttgttt aaaacttgga aattatcgtg atcaacaagt	3180
ttattttctg tagttttgca taatttatgg tctatttcaa tggcagttac gaaattacac	3240
ctctttacta attcaaggtt aaaatggcct tttctgagc cgatttcaa gatattatca	3300

tggtcattta atcttatatt tgtcattatt ttatctatat tatgttttga agtaataaag	3360
ttttgactgt gttttatatt tttctcgttc attataaacc tctttaattt gggtatatga	3420
atattgctta ttaacgatto attataacca cttatttttt gtttggttga taatgaactg	3480
tgtcgattac aaaaatacta aaaatgccca tattttttcc tccttataaa attagtataa	3540
ttatagcacg ggtcgagatc catgttcttt cctgcgttat cccctgatto tgtggataac	3600
cgtattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac cgagcgcagc	3660
gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgct	3720
tggccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagtgag	3780
cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac ccaggtctt acactttatg	3840
cttcggctc gtatgttggtg tggaaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc	3900
tatgaccatg attacgcaa gcttgcattg ctgcaggctg actctagagg atcctatata	3960
caattgagca aaagaaattt agttattaaa ttaccagctg gagttcctcc aatggttgta	4020
gattcactaa gtccagcaat tatttcaatg gtgattttct gtttgatggt cgggattcgt	4080
gtgggattct cttatacgcc attccatgat attttcaatt tctcaacaca actaattcaa	4140
gcaccgttga ctggtgctgt ggcaaatcca tgggttctta tgggcattct tacctttggt	4200
aatttcttat ggttcttttg tatccacct aatttaattg ggggaatttt aaatccattg	4260
ttattaacaa tgtcatatgc taatattgat gcctatgctg ccggaaaacc tgtaccatac	4320
ttacaaatga tgattgtgtt tgctgtgggt gcgaacgcat ggggcggaag tggaaatact	4380
tatgggtag ttatttcaat gtttacggca aaatctgaac gctataaaca attattaaaa	4440
ttaggtgcaa ttocctagat tttcaatct agtgaacct tacttttttg tcttccaatg	4500
atgttaaact ctcttttctt tattcctttg gttttccaac cagcaatttt aggaactgta	4560
gcattgggct tggcaaagat attatatatt acaaatctga atccaatgac ggcacttctt	4620
ccttggaaga caccagcacc tgtgagaatg gccatttcag gtggacttcc atttttgatt	4680
atttttgcaa tctgtttagt cttgaatggt cttattttact accatttctt taagggtggcg	4740
tataataaag ctttagaaga agaaaaagca gctggtgaat taga	4784

<210> 25

<211> 4936

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pOThy15

<400> 25

gattaagtca tcttacctct tttattagtt ttttcttata atctaattgat aacattttta	60
taattaatct ataaaccata tccctctttg gaatcaaat ttattatcta ctcttttgta	120
gatatgttat aatacaagta tcagatctgg gagaccacaa cggtttccca ctagaaataa	180
ttttgtttta ctttagaaag gagatatacg catgaaaaaa aagattatct cagctatttt	240

aatgtctaca gtcatacttt ctgctgcagc cccgttgtca ggtgtttacg cctcagctgg	300
tcaaggtact caatcagaaa actcatgtac tcactttcca ggtaacttgc caaacatgct	360
tcgtgatattg cgtgatgctt tttcacgtgt taaaactttt tttcaaatga aagatcaact	420
tgataacttg cttttgaaag aatcactttt ggaagatttt aaaggttacc ttggttgtca	480
agctttgtca gaaatgatcc aattttacct tgaagaagtt atgccacaag ctgaaaacca	540
agatccagat atcaaagctc acgttaactc attgggtgaa aaccttaaaa ctttgctct	600
tcgtttgctg cgttgtcacc gttttcttcc atgtgaaaac aaatcaaaag ctgttgaaca	660
agttaaaaac gcttttaaca aattgcaaga aaaaggatc tacaagcta tgtcagaatt	720
tgatatcttt atcaactaca tcgaagctta catgactatg aaaatccgta actaactaga	780
attaatctat aagttactga caaaactgtc agtaactttt tttgtgggaa aaatgtattt	840
ttatgaccgt aaagaatctg tcagtagaag tctgaaattc gtttaaaaat cgactagaat	900
aggctttaac gacaagatgt tttaaagagt acgctctaaa tgtatttttg tatttttgtt	960
tgattacgaa gtttaaattt aattgacaaa tgttttaaaa tgagtataat aggacttgta	1020
accgatttta tttttataaa ggagaaagaa agatgaacaa acttttactt ggaacagcct	1080
ttataggggc tagcttactg attggtgggg gtgctcatgc agatcaaag tttatcgttt	1140
gtataatcat aatactgggtg agcactctat acaactagtg ggacaccaa agaatgctaa	1200
tgtaagtgcg ggttggactt atgaagggtg cggttggatc gcaccaacaa caagttcaag	1260
cccagtttac cgtgtgtaca atccaaatgc attattacac aaaaagcaag tatgaagccc	1320
aaagtttagt aaataagggg tggaaatggg ataataacgg aaaggcggtc ttctattctg	1380
gaggttctca agccgtatat gtcgcttata atcccaatgc acaatctggc gctcacaatt	1440
acacggaaag tagctttgag caaaatagct tattgaatac tggttggaaa tatggggcag	1500
tagcttggtg cgggattgga gtaaaaaacg aaatgttaaa cattgctcaa attgtagtg	1560
gtaatttttc tagtattgtt ggaacttgga aagatacttc tggaaatatg cttgaaatta	1620
atgcaatggg aaatcttact ttaatatgga aaggggcaaa gaatcaaacc tttgaacttg	1680
gcgcaggtca acaatttaat ggaactgcag atattgcctt aaaaaatgga gagatttccc	1740
ctggtagtcc acttaacatt tttgttgtac caacagaagt gaattcactg gccgtcgttt	1800
tacaacgtcg tgactgggaa aacctggcg ttaccaact taatcgccct gcagcacatc	1860
cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggccgcac cgatcgccct tcccaacagt	1920
tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgctga tgcggtattt tctccttacg catctgtgcg	1980
gtatttcaca ccgcatatgg tgcactagaa ctagcgattc tgaaatcacc atttaaaaaa	2040
ctccaatcaa ataattttat aaagttagt taccactttg taatcataaa aacaacaata	2100
aagctactta aatatagatt tataaaaaac gttggcgaaa acgttggcga ttcgttggcg	2160
attgaaaaac cacttaaac cttgagccag ttgggataga gcgttttttg cacaaaaatt	2220
ggcactcggc acttaatggg gggtcgtagt acggaagcaa aattcgcttc ctttcccccc	2280

atTTTTTcc aaattccaaa tTTTTtcaa aaattttcca gcgctaccgc tgggcaaaat	2340
tgcaagcaat ttttaaaatc aaaccocatga gggaatttca ttccctcata ctcccttgag	2400
cctcctccaa ccgaaataga agggcgctgc gcttattatt tcattcagtc atcggttttc	2460
ataatctaac agacaacatc ttcgctgcaa agccacgcta cgctcaaggc cttttacgct	2520
acgataacgc ctgttttaac gattatgccg ataactaaac gaaataaacg ctaaaacgtc	2580
tcagaaacga ttttgagacg ttttaataaa aaatcgctag tccgaggcct cgacccgatt	2640
cacaaaaaat aggcacacga aaaacaagtt aagggatgca gtttatgcat cccttaactt	2700
acttattaaa taatttatag ctattgaaaa gagataagaa ttgttcaaag ctaatatgtt	2760
ttaaatcgtc aattcctgca tgttttaagg aattgttaaa ttgatttttt gtaaataattt	2820
tcttgatttc tttgttaacc catttcataa cgaaataatt atacttttgt ttatctttgt	2880
gtgatattct tgattttttt ctacttaatc tgataagtga gctattcact ttaggtttag	2940
gatgaaaata ttctcttgga accatactta atatagaaat atcaacttct gccattaaaa	3000
gtaatgccaa tgagcgtttt gtatttaata atcttttagc aaaccggtat tccacgatta	3060
aataaatctc attagctata ctatcaaaaa caattttgcg tattatatcc gtacttatgt	3120
tataagggtat attaccatat attttatagg attggttttt aggaaattta aactgcaata	3180
tatccttggt taaaacttgg aaattatcgt gatcaacaag tttattttct gtagttttgc	3240
ataatttatg gtctatttca atggcagtta cgaaattaca cctctttact aattcaaggg	3300
taaaaatggc ttttcctgag ccgatttcaa agatattatc atgttcattt aatcttatat	3360
ttgtcattat tttatctata ttatgttttt aagtaataaa gttttgactg tgttttatat	3420
ttttctcggt cattataacc ctctttaatt tgggttatat aattttgctt attaacgatt	3480
cattataacc acttattttt tgtttggttg ataatgaact gtgctgatta caaaaatact	3540
aaaaatgccc atattttttc ctccctataa aattagtata attatagcac gggtcgagat	3600
ccatgttctt tctcgcgta tccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt	3660
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgag cgagtcagtg agcgaggaag	3720
cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tcccgcgcg ttggccgatt cattaatgca	3780
gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga	3840
gttagctcac tcattaggca cccaggtt tacactttat gcttccggt cgtatgttgt	3900
gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag ctatgaccat gattacgcca	3960
agcttgcatg cctgcaggtc gactctagag gatcctatat acaattgagc aaaagaaatt	4020
tagttattaa attaccagct ggagttcctc caatggttgt agattcacta agtccagcaa	4080
ttatttcaat ggtgattttc tgtttgatgt tcgggattcg tgtgggattc tcttatacgc	4140
cattccatga tattttcaat ttctcaacac aactaattca agcaccgttg actggtgctg	4200
tggcaaatcc atgggttctt atgggcatct ttaccttgg taatttctta tggttctttg	4260
gtatccaccc taatttaatt gggggaattt taaatccatt gttattaaca atgtcatatg	4320

```

ctaattattga tgcctatgct gccggaaaac ctgtaccata cttacaaatg atgattgtgt 4380
ttgctgtggg tgcgaacgca tggggcgga gtggaaatac ttatgggtta gttatttcaa 4440
tgtttacggc aaaatctgaa cgctataaac aattattaaa attaggtgca attcctagta 4500
ttttcaatat cagtgaacca ttactttttg gtcttccaat gatgttaaatt cctcttttct 4560
ttattccttt gggttttccaa ccagcaattt taggaactgt agcattgggc ttggcaaaga 4620
tattatatat taaaaatctg aatccaatga cggcacttct tccttggacg acaccagcac 4680
ctgtgagaat ggccatttca ggtggacttc catTTTTgat ttttttgca atctgttttag 4740
tcttgaatgt tcttatttac taccattct ttaagggtgc gtataataaa gctttagaag 4800
aagaaaaagc agctgttgaa ttagagggtt cagaaactgc ctgatggata ttttttataa 4860
atctggtttg aacaaattat attgacatct ctttttctat cctgataatt ctgagagggt 4920
atTTTgggaa atacta 4936

```

<210> 26

<211> 4995

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pOThy16

<400> 26

```

aatttcgatt aagtcattctt acctctttta ttagtttttt cttataatct aatgataaca 60
tttttataat taatctataa accatatccc tctttggaat caaaatttat tatctactcc 120
tttgtagata tgttataata caagtatcag atctgggaga ccacaacggt ttcccactag 180
aaataatttt gtttaacttt agaaaggaga tatacgcattg aaaaaaaga ttatctcagc 240
tattttaatg tctacagtca tactttctgc tgcagcccg ttgtcagggtg tttacgcctc 300
agctgggtcaa ggtactcaat cagaaaactc atgtactcac tttccaggta acttgccaaa 360
catgcttcgt gatttgctg atgctttttc acgtgttaa actttttttc aaatgaaaga 420
tcaacttgat aacttgcttt tgaagaatc acttttgga gattttaaag gttaccttgg 480
ttgtcaagct ttgtcagaaa tgatccaatt ttaccttgaa gaagttatgc cacaagctga 540
aaaccaagat ccagatatca aagctcacgt taactcattg ggtgaaaacc ttaaaacttt 600
gcgtcttcgt ttgcgtcgtt gtcaccgttt tcttccatgt gaaaacaaat caaaagctgt 660
tgaacaagtt aaaaacgctt ttaacaaatt gcaagaaaaa ggtatctaca aagctatgtc 720
agaatttgat atctttatca actacatcga agcttacatg actatgaaaa tccgtaacta 780
actagaatta atctataagt tactgacaaa actgtcagta actttttttg tgggaaaaat 840
gtatttttat gaccgtaaag aatctgtcag tagaagtctg aaattcgttt aaaaatcgac 900
tagaataggc tttaacgaca agatgtttta aagagtacgc tctaaatgta tttttgtatt 960
tttgtttgat tacgaagttt aaatttaatt gacaaatgtt ttaaaatgag tataatagga 1020
cttgaaccg attttatttt tataaaggag aaagaaagat gaacaaactt ttacttggaa 1080

```

cagcctttat	aggggctagc	ttactgattg	gtgggggtgc	tcatgcagat	caaatgttta	1140
tcgtttgtat	aatcataata	ctggtgagca	ctctatacaa	ctagtgggac	accaaaagaa	1200
tgctaagtga	agtgcggggt	ggacttatga	aggtgtcggg	tggatcgcac	caacaacaag	1260
ttcaagccca	gtttaccgtg	tgtacaatcc	aaatgcatta	ttacacaaaa	agcaagtatg	1320
aagcccaaag	tttagtaaat	aagggttgga	aatgggataa	taacggaaaag	gcggtcttct	1380
attctggagg	ttctcaagcc	gtatatgtcg	cttataatcc	caatgcacaa	tctggcgctc	1440
acaattacac	ggaaagtagc	tttgagcaaa	atagcttatt	gaatactggg	tggaaatatg	1500
gggcagtagc	ttggtacggg	attggagtaa	aaaacgaaat	gttaaacatt	gctcaaattg	1560
ttagtggtaa	tttttctagt	attgttggaa	cttggaaaga	tacttctgga	aatatgcttg	1620
aaattaatgc	aatgggaaat	cttactttaa	tatggaaagg	ggcaaagaat	caaacctttg	1680
aacttggcgc	aggccaacaa	tttaatggaa	ctgcagatat	tgccttaaaa	aatggagaga	1740
tttcccctgg	tagtcacact	aacatTTTTT	ttgtaccaac	agaagtgaat	tcactggccg	1800
tcgttttaca	acgtcgtgac	tgggaaaacc	ctggcgttac	ccaacttaat	cgccttgacg	1860
cacatcccc	tttcgccagc	tggcgtaata	gcgaagaggc	ccgcaccgat	cgccttccc	1920
aacagttgcg	cagcctgaat	ggcgaatggc	gcctgatgcg	gtattttctc	cttacgcac	1980
tgtgcggtat	ttcacaccgc	atatggtgca	ctagaactag	cgattctgaa	atcaccattt	2040
aaaaaactcc	aatcaataa	ttttataaag	ttagtgtatc	actttgtaat	cataaaaaca	2100
acaataaagc	tacttaaata	tagatttata	aaaaacgttg	gcgaaaacgt	tggcgattcg	2160
ttggcgattg	aaaaaccctt	taaacccttg	agccagttgg	gatagagcgt	ttttggcaca	2220
aaaattggca	ctcggcactt	aatggggggg	cgtagtacgg	aagcaaaatt	cgttctcttt	2280
ccccccattt	ttttccaaat	tccaaatttt	tttcaaaaat	tttccagcgc	taccgctcgg	2340
caaaattgca	agcaattttt	aaaatcaaac	ccatgaggga	atttcattcc	ctcatactcc	2400
cttgagcctc	ctccaaccga	aatagaaggg	cgctgcgctt	attatttcat	tcagtcatcg	2460
gctttcataa	tctaacagac	aacatcttcg	ctgcaaagcc	acgctacgct	caagggcttt	2520
tacgctacga	taacgcctgt	tttaacgatt	atgccgataa	ctaaacgaaa	taaacgctaa	2580
aacgtctcag	aaacgatttt	gagacgtttt	aataaaaaat	cgctagtccg	aggcctcgac	2640
ccgattcaca	aaaaataggc	acacgaaaaa	caagttaagg	gatgcagttt	atgcatccct	2700
taacttactt	attaaataat	ttatagctat	tgaaaagaga	taagaattgt	tcaaagctaa	2760
tattgtttta	atcgtcaatt	cctgcattgt	ttaaggaatt	gttaaattga	ttttttgtaa	2820
atattttctt	gtattctttg	ttaacccttt	tcataacgaa	ataattatac	ttttgtttat	2880
ctttgtgtga	tattcttgat	ttttttctac	ttaatctgat	aagtgcgcta	ttcactttag	2940
gttttaggatg	aaaatattct	cttggaaacca	tacttaatat	agaaatatca	acttctgcca	3000
ttaaaagtaa	tgccaatgag	cgttttgtat	ttaataatct	tttagcaaac	ccgtattcca	3060
cgattaaata	aatctcatta	gctatactat	caaaaacaat	tttgcgtatt	atatccgtac	3120

```

ttatgttata aggtatatta ccatatattt tataggattg gtttttagga aatttaaact 3180
gcaatatatc cttgtttaaa acttggaat tatcgtgac aacaagttta ttttctgtag 3240
ttttgcataa tttatggctt atttcaatgg cagttacgaa attacacctc tttactaatt 3300
caagggtaaa atggcctttt cctgagccga tttcaaagat attatcatgt tcatttaatc 3360
ttatatttgt cattatttta tctatattat gttttgaagt aataaagttt tgactgtgtt 3420
ttatattttt ctcgttcatt ataaccctct ttaatttggg tatatgaatt ttgcttatta 3480
acgattcatt ataaccactt attttttggg tgggtgataa tgaactgtgc tgattacaaa 3540
aatactaaaa atgccatat tttttcctcc ttataaaatt agtataatta tagcacgggt 3600
cgagatccat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct 3660
ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg 3720
aggaagcggg agagcgccca atacgcaaac cgctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt 3780
aatgcagctg gcacgacagg tttcccgaact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta 3840
atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgta 3900
tggtgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt 3960
acgccaagct tgcattgctg caggctgact ctagaggatc ctatatacaa ttgagcaaaa 4020
gaaatttagt tattaataa ccagctggag ttctccaat gggtgtagat tcaactaagtc 4080
cagcaattat ttcaatggg attttctgtt tgatgttcgg gattcgtgtg ggattctctt 4140
atacgccatt ccattgatatt ttcaatttct caacacaact aattcaagca ccgttgactg 4200
gtgctgtggc aaatccatgg gttcttatgg gcattctttac ctttggtaat ttcttatggg 4260
tctttgggat ccacccta attaattgggg gaattttaaa tccattgtta ttaacaatgt 4320
catatgctaa tattgatgcc tatgctgccc gaaaacctgt accatactta caaatgatga 4380
ttgtgtttgc tgtgggtgcg aacgcatggg gcggaagtgg aaatacttat gggtagtta 4440
ttcaatggt tacggcaaaa tctgaacgct ataaacaatt attaaaatta ggtgcaattc 4500
ctagtatttt caatatcagt gaaccattac tttttggtct tccaatgatg ttaaatcctc 4560
ttttctttat tcttttgggt ttccaaccag caattttagg aactgtagca ttgggcttgg 4620
caaagatatt atatattaca aatctgaatc caatgacggc acttcttctc tggacgacac 4680
cagcacctgt gagaatggcc atttcagggt gacttccatt tttgattatt tttgcaatct 4740
gttttagtct gaatgttctt atttactacc cattctttta ggtggcgtat aataaagctt 4800
tagaagaaga aaaagcagct gttgaattag aggggtcaga aactgcctga tggatatttt 4860
ttataaatct ggtttgaaca aatttatattg acatctcttt ttctatcctg ataattctga 4920
gaggttattt tgggaaatac tattgaacca tatcgagggt tgtggtataa tgaaggaat 4980
taaaaaagat aggaa 4995

```

Patentansprüche

1. Verwendung eines isolierten *Lactococcus* sp. Stamms, umfassend ein Thymidylat-Synthase-Gen, das mittels Gendisruption inaktiviert wurde für die Zubereitung eines Medikaments für die Zufuhr eines prophylaktischen und/oder therapeutischen Moleküls.
2. Die Verwendung eines isolierten *Lactococcus* sp. Stamms nach Anspruch 1, wobei das Thymidylat-Synthase-Gen durch das Gen, das für das prophylaktische und/oder therapeutische Molekül kodiert disruptiert wird.
3. Die Verwendung eines isolierten *Lactococcus* sp. Stamms nach Anspruch 1 oder 2, wobei das prophylaktische und/oder therapeutische Molekül Interleukin 10 ist.

4. Die Verwendung eines isolierten *Lactococcus* sp. Stamms nach Anspruch 3 für die Zubereitung eines Medikaments zur Behandlung entzündlicher Darmerkrankung.

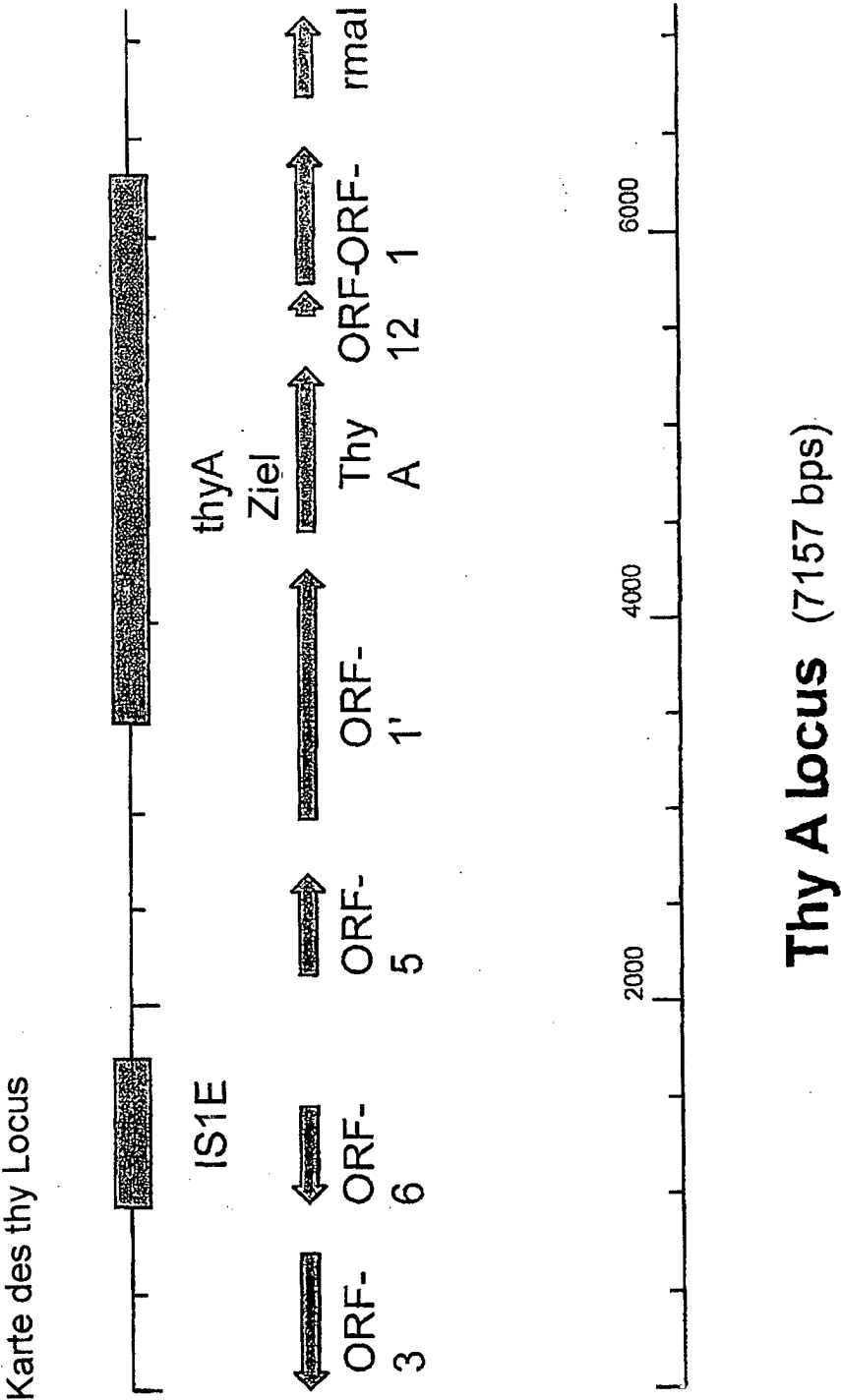
5. Eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend einen isolierten *Lactococcus* sp. Stamm, der ein prophylaktisches und/oder therapeutisches Molekül herstellt, wobei der Stamm ein Thymidylat-Synthase-Gen umfasst, das mittels Gendisruption inaktiviert ist.

6. Die pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei das Thymidylat-Synthase-Gen durch das Gen, das für das prophylaktische und/oder therapeutische Molekül kodiert, disruptiert wird.

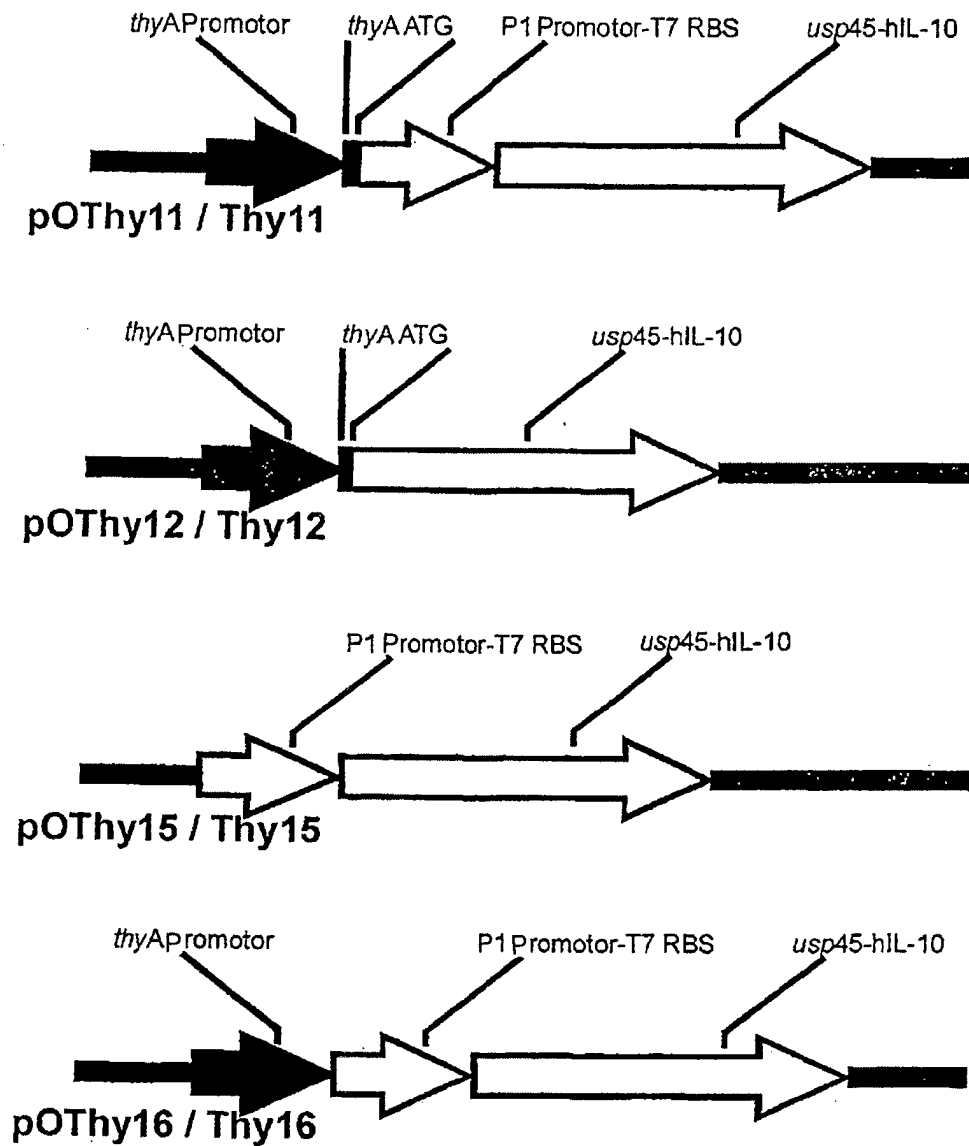
7. Die pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 4 oder 5, wobei das prophylaktische und/oder therapeutische Molekül Interleukin 10 ist.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

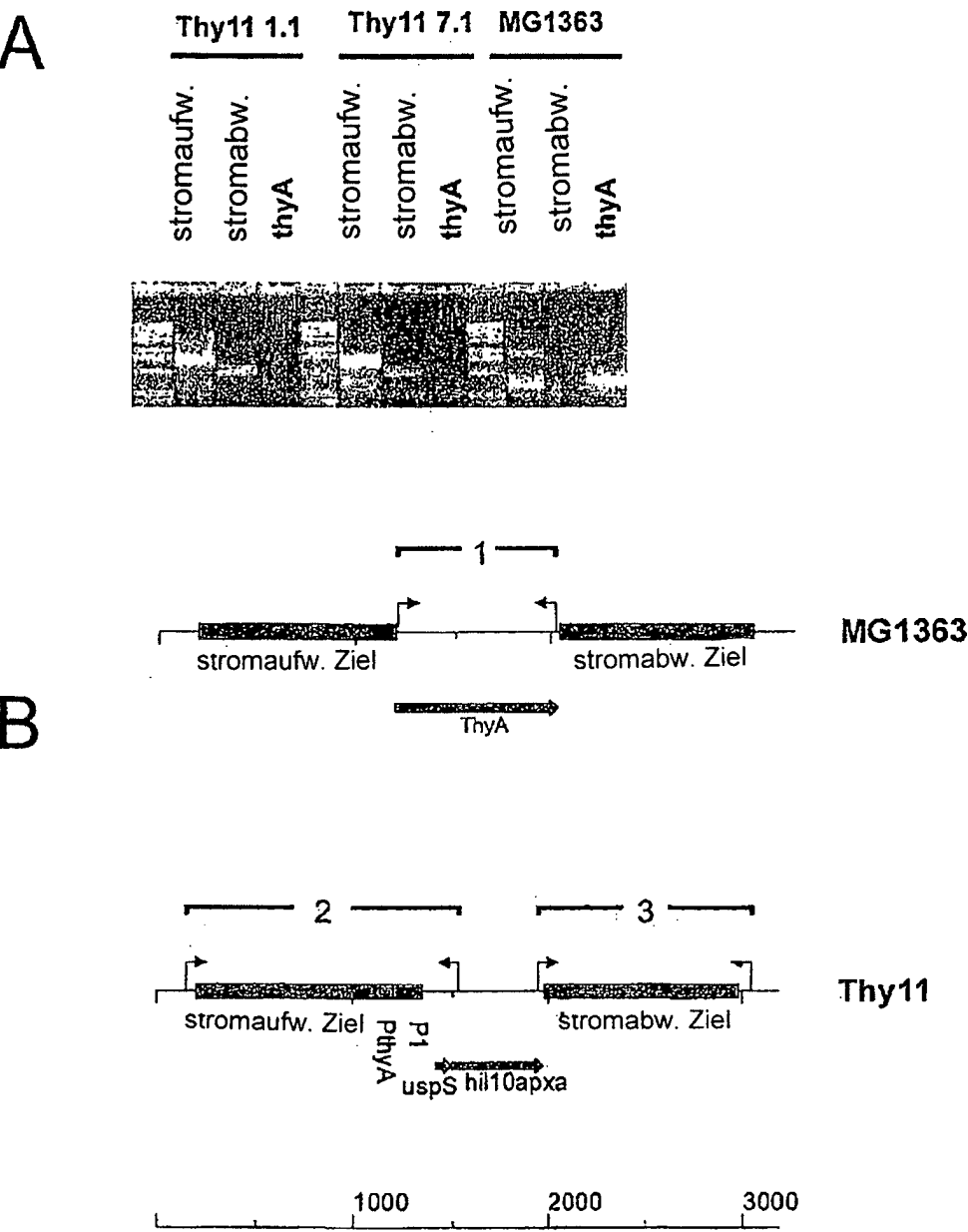
Figur 1:



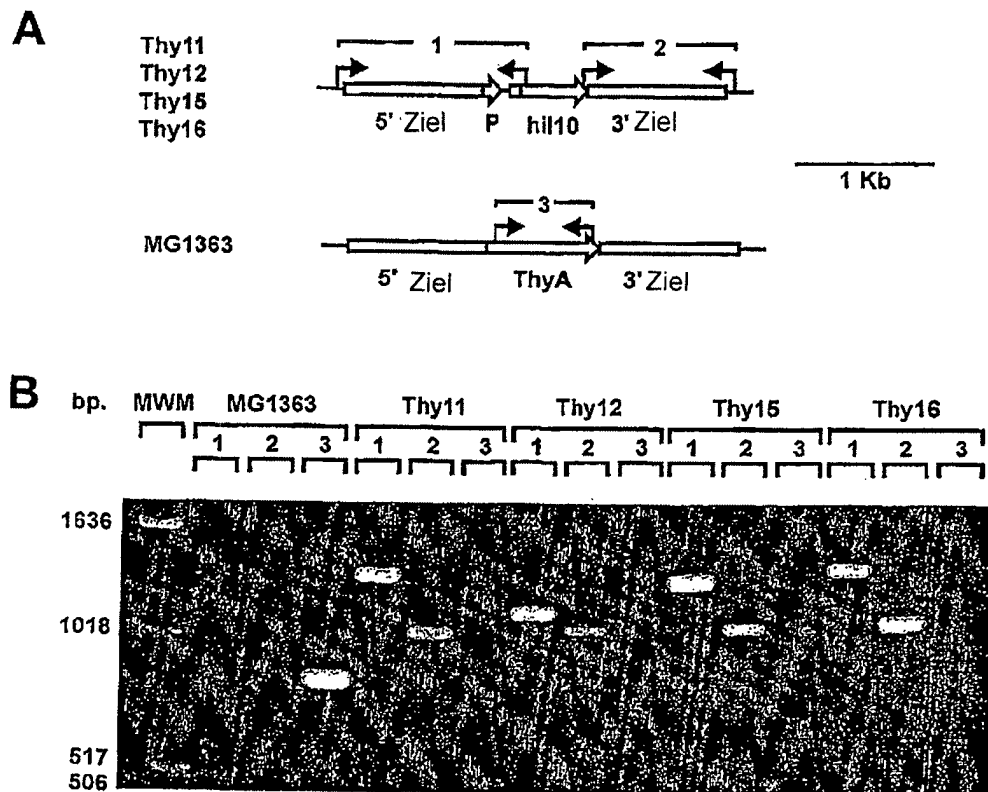
Figur 2:



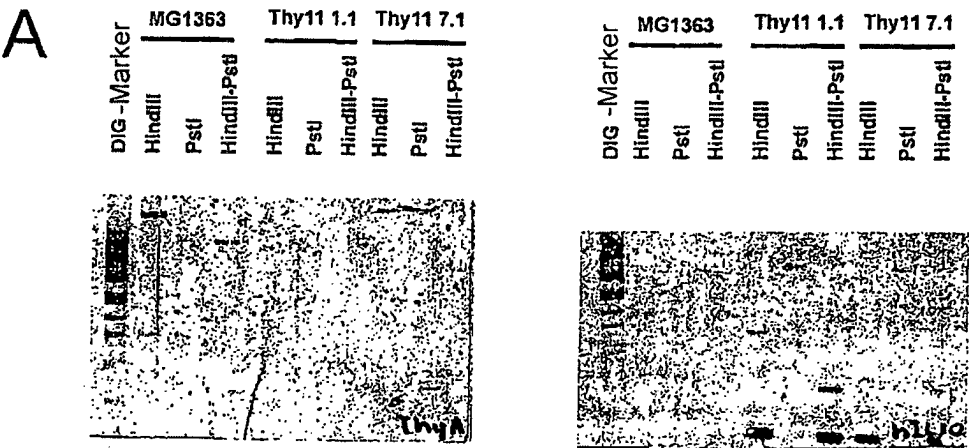
Figur 3:



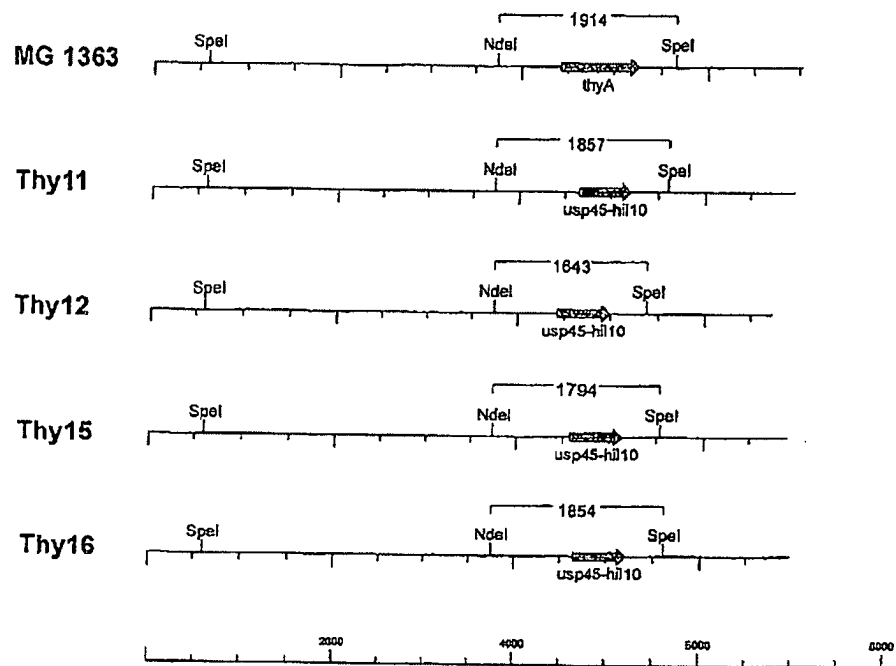
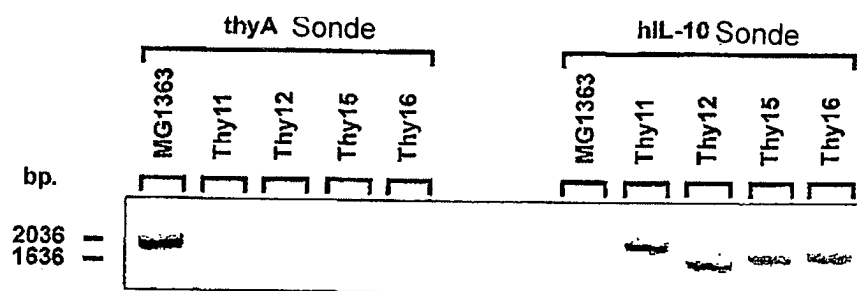
Figur 4:



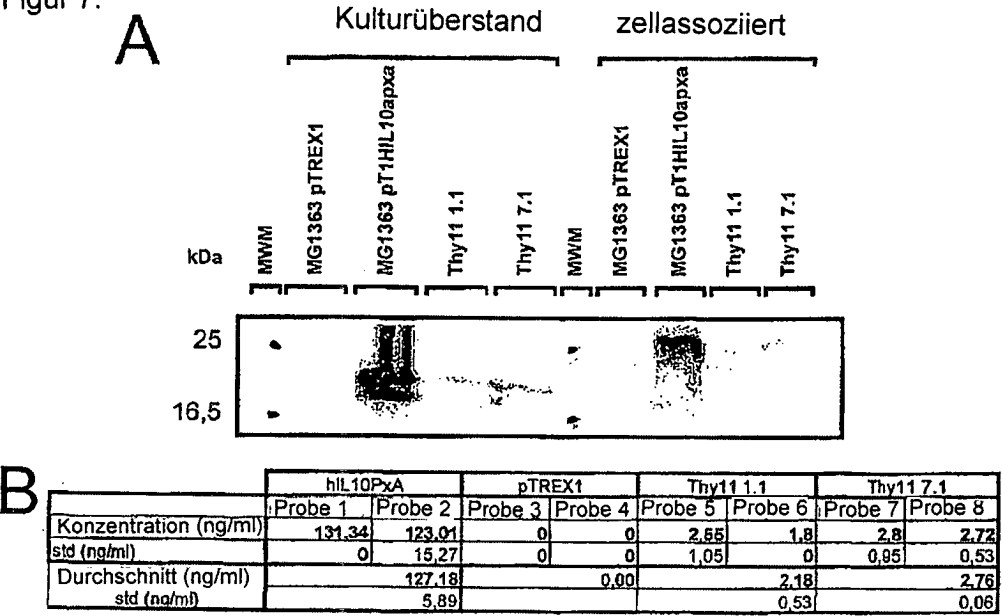
Figur 5:



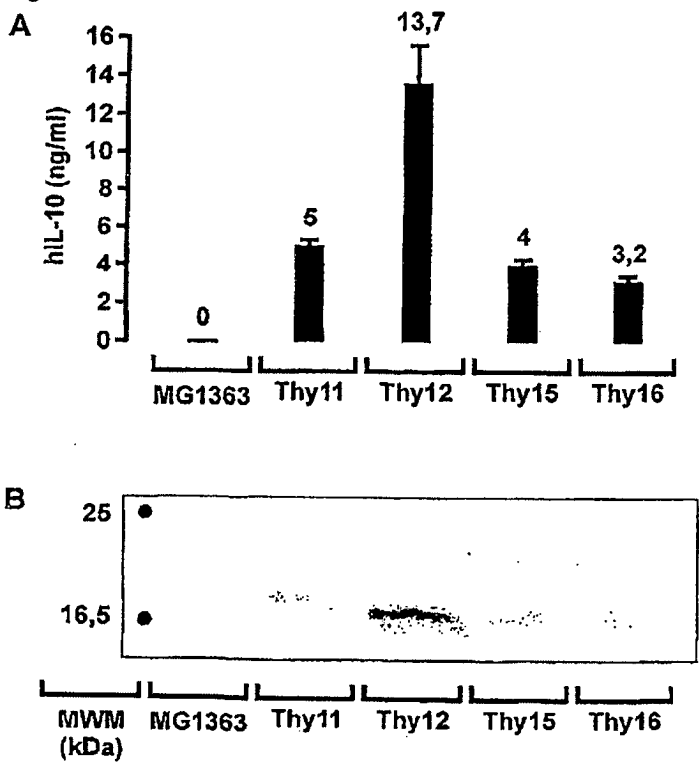
Figur 6:

A**B**

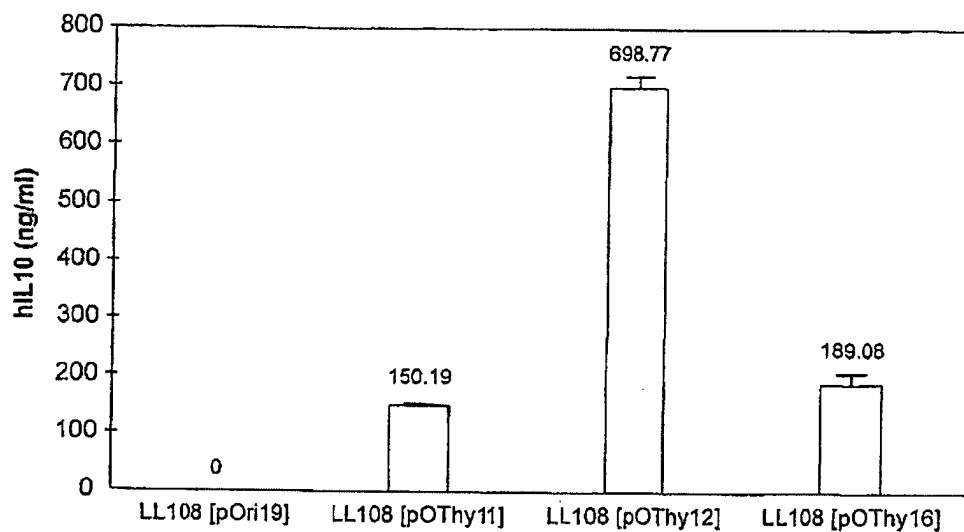
Figur 7:



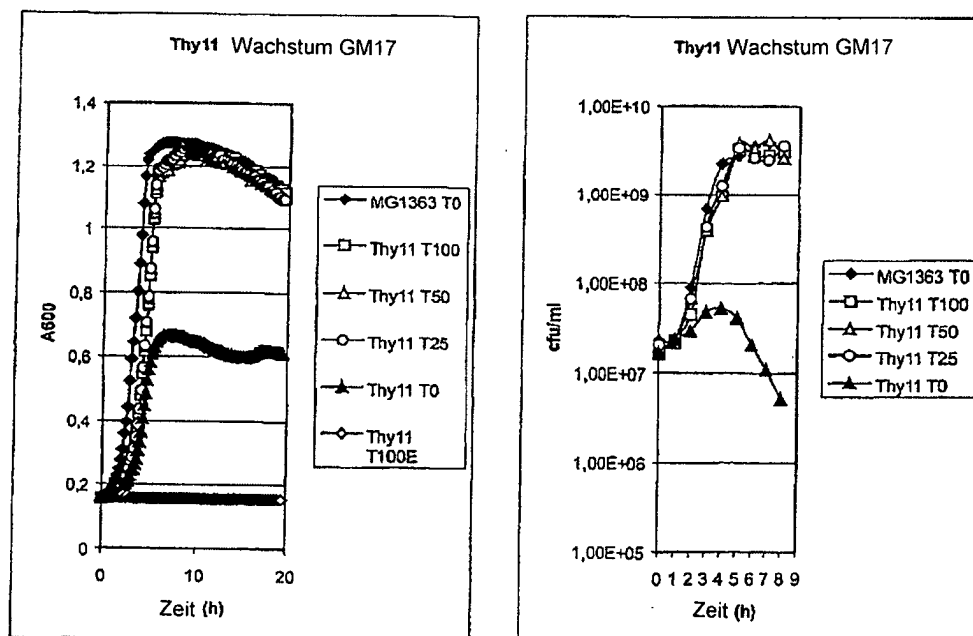
Figur 8:



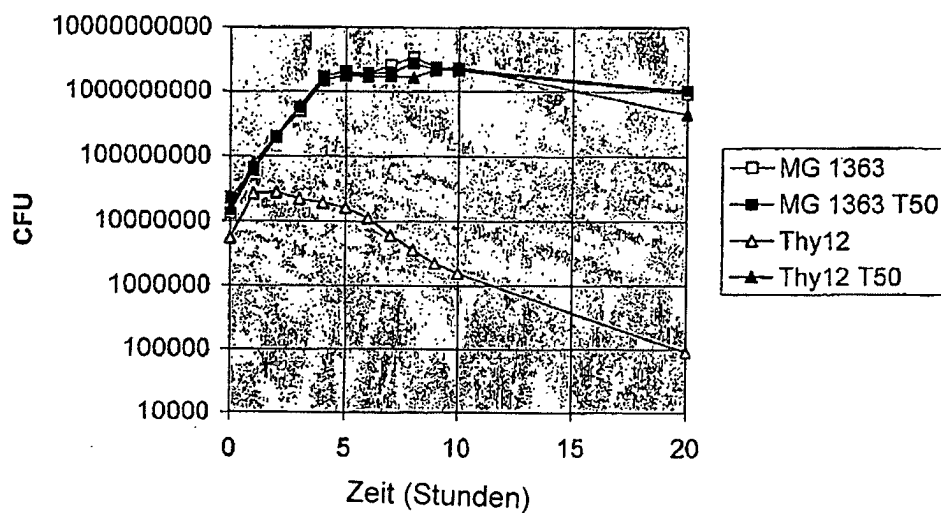
Figur 9:



Figur 10:



Figur 11:



Figur 12:

