

Prisustvo PKS gena u bakterijskoj populaciji Petničkog jezera

Poliketid sintaze (PKS) omogućuju sintezu poliketida, klase sekundarnih metabolita sa širokom primenom, pogotovo u medicini (antibiotici, imunosupresanti, antikancer lekovi). Zbog toga je od velike važnosti otkrivanje i proučavanje karakteristika novih poliketida i enzima koji učestvuju u njihovoj sintezi. Od bakterija koje su pronađene u mulju Petničkog jezera dokazano je prisustvo PKS gena kod tri soja. Analizom sekvenci dela gena za 16S rRNK je otkriveno da jedan soj pripada rodu Bacillus, dok su druga dva nekultivisani sojevi. Dalja istraživanja bi trebalo da obuhvate karakterizaciju PKS enzima i poliketida koje proizvode ova tri soja.

Uvod

Poliketidi čine veliku klasu sekundarnih metabolita pronađenih u biljkama, životinjama i mikroorganizmima. Imaju široku primenu u medicini i agrikulturi. Upotrebljavaju se kao antibiotici, imunosupresanti, antiparazitici, lekovi za snižavanje nivoa holesterola, antimikotici i antikancer lekovi (Weissman 2004; Savić i Vasiljević 2006).

Nastanak kompleksnih poliketida omogućuju multifunkcionalni enzimi poliketid sintaze (PKS) učestvujući u prvom koraku formiranja poliketidnog produkta koji podleže kasnijim modifikacijama od strane pomoćnih enzima (Savić i Vasiljević 2006). PKS sadrže veliki broj različitih katalitičkih domena organizovanih u module. Svaki modul enzima katalizuje jedan korak elongacije, koji se sastoji iz kondenzacije acil tioestra kratke karboksilne kiseline (grupa za elongaciju) na početnu grupu (malonil-CoA ili metilmalonil-CoA) i različitih modifikacija dodate grupe (Weissman 2004; Foerstner *et al.* 2008). Biološku aktivnost sintetisanog molekula omogućavaju modifikacije od strane pomoćnih enzima (tailoring/ancillary enzymes) (Cane *et al.* 1998). Prema rasporedu katalitičkih domena PKS se klasifikuju u tri grupe. Kod PKS I tipa jedan enzim sadrži

*Filip Ilić (1993),
Beograd, Kapetana
Popovića 3, učenik 3.
Razreda XIII beogradske
gimnazije*

MENTORI:

*Aleksandra Vančevska,
student Hemijskog
fakulteta u Univerzitetu
u Beogradu*

*Iva Pruner, Institut za
molekularnu genetiku i
genetičko inženjerstvo,
Beograd*

više domena i domeni su kod bakterija najčešće organizovani u module odgovorne za po jedan korak kondenzacije i modifikacije, za razliku od drugog tipa PKS koji su agregati proteina sa po jednim domenom. Postoji i treći tip PKS koje nemaju ACP domen (acyl carrier protein) koji nosi tioestre elongacionih grupa već koriste CoA tioestre kao grupe za elongaciju (Savić i Vasiljević 2006; Foerstner *et al.* 2008).

PKS geni su zajedno sa pomoćnim enzimima organizovani u klastere i kod bakterija su unutar jednog operona (Cane *et al.* 1998; Stinear *et al.* 2004). Osim na genomskoj DNK mogu da se nalaze i na plazmidima (Stinear *et al.* 2004). Pošto su ketosintazni (KS) domeni poliketid sintaza visoko konzervisani najčešće se oni koriste za detekciju PKS gena (Savić i Vasiljević 2006).

Bakterije i ostali prokarioti poseduju 16S ribozomalnu RNK koja je deo 30S subjedinice ribozoma. Geni za 16S rRNK (16S rDNK) su dugački oko 1550 bp i koriste za filogenetske analize zbog istovremenog prisustva konzervisanih i varijabilnih sekvenci (Clarridge 2004).

Cilj rada je bio pronalaženje bakterija koje poseduju PKS gene i njihova identifikacija pomoću 16S rRNK.

Materijali i metode

Uzorkovanje mulja. Mulj je uzorkovan iz Petničkog jezera i potoka koji se uliva u njega. Uzorkovanje je vršeno u sterilnim uslovima, a uzorci su čuvani na 4°C.

Medijumi. Decimalna razblaženja mulja su zasejavana na LA i SFM podloge. LA podloga je korišćena za gajenje velikog broja bakterijskih sojeva i za selekciju bakterija rezistentnih na antibiotike dodavanjem ampi-



Slika 1.
Mesta uzorkovanja
mulja: J – jezero,
P – potok

Figure 1.
Sampling sites:
J – lake. P – stream

cilina, eritromicina ili gentamicina (100 mg/mL antibiotika). SFM podloga je korišćena za favorizovanje aktinomiceta. U podloge je dodavan cikloheksimid kao antimikotik. Sojevi odabrani za dalju analizu su gajeni u tečnoj LB podlozi.

Tabela 1. Sastav korišćenih medijuma

LA (Lysogeny Broth Agar)	SFM (Soy Flour Mannitol)	LB (Lysogeny Broth)
1% Bakto tripton	2% Soja brasno	1% Bakto tripton
1% NaCl	2% Manitol	1% NaCl
0.5% Ekstrakt kvasca	5mM MgCl ₂	0.5% Ekstrakt kvasca
1.5% Agar	2% Agar	

Pre upotrebe svaki medijum je bio sterilisan 20 min na 121°C u autoklavu.

Razblaživanje uzoraka mulja i gajenje bakterija. Napravljena su 10⁻³ razblaženja mulja (1 g mulja/L) u kalijum fosfatnom puferu (50 mM, pH 7.2) i zatim zasejana na čvrste podloge. Po jedna šolja sa LA i SFM podlogom su nakon zasejavanja inkubirane 20 min na 90°C zarad favorizovanja bakterija sa endosporama. Nakon toga su sve zasejane šolje inkubirane preko noći na 30°C. Na osnovu različitog morfološkog izgleda selektovane su kolonije za dalju analizu koje su zasejane u LB medijum i inkubirane preko noći na 30°C. Selektovani sojevi su zatim prebaćeni na podloge sa antibioticima. Za konačnu analizu su korišćeni sojevi rezistentni na antibiotike.

Izolacija genomske i plazmidne DNK. Plazmidna i genomska DNK su izolovane iz svih sojeva koji su porasli na antibioticima radi provere prisustva PKS gena. Genomska DNK je korišćena i za amplifikaciju i kasnije sekvenciranje fragmenta 16S rDNK kod sojeva koji su imali PKS gene.

Izolacija genomske DNK fenol/hloroformskom metodom. Alikvoti bakterijske kulture (1.5 mL) su prebaćeni u mikrotube i centrifugirani (1 min, 13400 rpm). Nakon centrifugiranja je ostavljeno 200 µL supernatanta u mikrotubi, dodato 30 µL 10% SDS-a (natrijum dodecil sulfat) i promešano. Zatim su mikrotube inkubirane 10 min na 50°C pa centrifugirane (10 min, 13400 rpm). Supernatanti su prebaćeni u nove mikrotube i dodato je 250 µL fenol/hloroforma (u odnosu 1/24) i centrifugirano (10 min, 13400 rpm). Korak je ponovljen. Supernatanti su prebaćeni u novu mikrotubu, dodato je 50 µL natrijum acetata (AcONa) (3 M, pH 5.2) i 85 µL izopropanola. Mikrotube su zatim ohlađene pa centrifugirane

(10 min 13400 rpm). Odbačen je supernatant i talog je ispran sa 1mL 70% EtOH, zatim osušen pa resuspendovan u 20 μ L dH₂O.

Izolacija plazmidne DNK (10 min Mini Prep). Alikvoti prekonocne bakterijske kulture (1.5mL) su bili oboreni centrifugiranjem 20 s. Ostavljeno je 100 μ L supernatanta u mikrotubama pa vorteksovano. U mikrotube je dodato 300 μ L TENS pufera (1 \times TE: 1mM Tris HCl pH 8.0; 0.1 mM EDTA), 0.1 M NaOH, 0.5% SDS (0.5mL 10% SDS) pa vorteksovano. Nakon toga je dodato 150 μ L AcONa (pH 5.2), mikrotube su kratko vorteksovane i onda centrifugirane 2 min. Supernatanti su prebačeni u nove mikrotube, i dodato je 1 mL hladnog 95% EtOH. Mikrotube su centrifugirane 2 min i talog je ispran sa 500 μ L hladnog EtOH, zatim osušen. DNK je resuspendovana u 30 μ L dH₂O.

PCR reakcija. Reakcija lančane polimerizacije (PCR) je korišćena radi amplifikacije fragmenata 16S rDNK i dela PKS gena. Sekvence prajmera su date u tabeli 2 (Savić i Vasiljević 2006; Marchesi *et al.* 1998).

Tabela 2. Sekvence korišćenih prajmera

Analizirani segment	Prajmer	Sekvenca prajmera	Dužina amplifikovanog fragmenta
16S rDNK	20F	5'TTTGATCCTGGCTCAG 3'	1367 bp
	1492R	5'TACCTTGTTACGACTT 3'	
N-terminus β -ketoacil-ACP sintaznog domena PKS gena	MAK1	5' GACACSGCSTGYTCBTCGTCG 3'	300 bp
	MAK3	3' CASTTGGTCCTGCCRCGCAGSTTGCC 5'	
		B=G+C+T, R=G+A, S=G+C, Y=C+T	
		B=G+C+T, R=G+A, S=G+C, Y=C+T	

PCR program za umnožavanje dela PKS gena:

94°C / 5 min

94°C / 30 s

55°C / 30 s

72°C / 30 s

72°C / 10min

} 30 \times

PCR program za umnožavanje dela 16S rDNK:

95°C / 3 min

95°C / 40 s

60°C / 1 min

72°C / 2 min

72°C / 10 min

} 30 \times

Tabela 3. Sastavi smeša za PCR reakciju (u μL)

Komponente PCR smeše	Amplifikacija fragmenta PKS gena	Amplifikacija dela 16S rDNK
dH ₂ O	22.6	30.1
MgCl ₂ (25 mM)	5	5
dNTP (2 mM)	5	5
Reaction Buffer B	5	5
Prajmer 1 (10 pmol/ μL)	1	1
Prajmer 2 (10 pmol/ μL)	1	1
DNK	10	1 (50 ng DNK)
FIREpol polimeraza	0.4	0.4
DMSO (dimetil sulfoksid)	0	1.5

PCR aparat korišćen je bio Eppendorf Master Cycler Gradient.

Prečišćavanje DNK (Fermentas GeneJET PCR purification kit). U mikrotubu sa PCR produktom je dodat Binding Buffer u odnosu 1 : 1. Rastvor je prebačen u GeneJET kolonicu za prečišćavanje, zatim su kolone centrifugirane nakon čega je filtrat odbačen. U kolone za prečišćavanje je dodato 700 μL Wash Buffer-a, kolone su centrifugirane 1 min, a filtrat odbačen. DNK je eluirana sa kolona dodavanjem 30 μL dH₂O i centrifugiranjem 1 min. DNK je čuvana na -20°C .

Restrikciona analiza fragmenta 16S rDNK. PCR produkti su podvrgnuti digestiji HhaI restrikcionim enzimom (Amersham Biosciences). Zapremina reakcione smeše za digestiju je bila 25 μL (10 unit-a Hha I – 1 μL , 1.5 μL dH₂O, 2.5 μL M buffer (10 \times : 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 10 mM ditiotritol, 500 mM NaCl), 20 μL prečišćenog PCR produkta). Reakcione smeše su inkubirane 2 h na 30°C , nakon čega su reakcije prekidane stavljanjem digestija na 4°C .

Elektroforeza na agaroznom gelu. Prisustvo plazmida u sojevima je proveravano elektroforezom na 1% agaroznom gelu napravljenom u 1 \times TAE puferu (40 mM Tris, 20 mM AcONa, 1 mM Na₂EDTA). U gel je nanošeno 10 μL izolovane plazmidne DNK pomešano sa 5 μL Orange G boje. Provera PCR reakcije je vršena puštanjem 8 μL PCR produkta pomešanog sa 5 μL Orange G boje na 2% agarozni gel napravljen u TAE puferu.

Fragmenti dobijeni digestijom 16S rDNK PCR produkta su razdvajani na 2% agaroznom gelu pravljenom u 1 \times TBE puferu (89 mM Tris, 89 mM H₃BO₃, 2 mM Na₂EDTA). U gel je nanošeno 10 μL produkta digestije pomešanog sa 5 μL Orange G boje.

Svaki gel je sadržao 1 μL /10 mL rastvora etidijum bromida, osim gela na kom su puštani produkti digestije koji je sadržao 1.5 μL /10mL

rastvora etidijum bromida. Vizuelizacija traka je vršena CCD kamerom, osvetljavanjem gela UV svetlom talasne dužine 266 nm.

Sekveneciranje fragmenata 16S rDNK i analiza sekvenci. Fragmenti 16S rDNK bakterija koje su nosile PKS gene su sekvencirani pomoću komercijalnog kita BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Prajmeri korišćeni su bili 20F i 1492R.

Reakcija sekvenciranja je vršena u smeši ukupne zapremine 8 μ L (2 μ L Ready Reaction Mix, 1 μ L prajmera (3.2 pmol/ μ L) i 5 μ L DNK). Program po kome je vršeno umnožavanje:

96°C / 1 min	} 25 ×
96°C / 10 s	
50°C / 5 s	
60°C / 4 min	

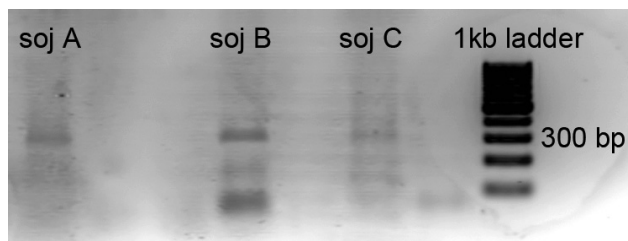
Nakon reakcije sekvenciranja u 8 μ L reakcione smeše je dodato 40 μ L rastvora A (0.1125 M AcONa pH 5.2; 75% EtOH; dH₂O), zatim su mikrotube centrifugirane 10 min na 13400 rpm. Supernatant je odbačen i talog ispran sa 200 μ L 70% EtOH. Nakon toga mikrotube su centrifugirane 10 min na 13400 rpm, supernatant odbačen i talog osušen. Talog je resuspendovan u 20 μ L HiDI Formamide uz pomoć vorteksovanja.

Posle resuspendovanja smeša je puštena u sekvencer (Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer).

Dobijene sekvence su korišćenjem BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) algoritma upoređene sa sekvencama poznatih 16S rRNK gena.

Rezultati i diskusija

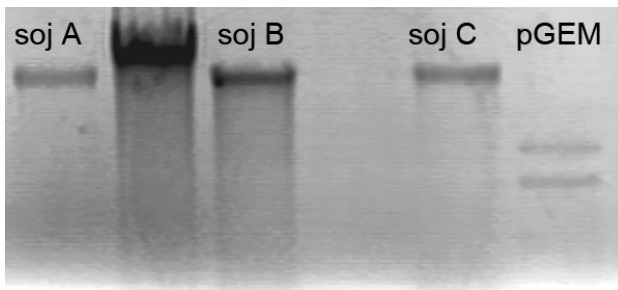
Kod tri soja su dobijeni fragmenti PKS gena na genomskoj DNK odgovarajuće dužine od približno 300 bp (slika 2). Od ta tri soja soj A je rezistentan na ampicilin, soj B i na ampicilin i na eritromicin a soj C na eritromicin. Dokazano je prisustvo plazmida kod sva tri soja (slika 3). Sa obzirom na položaj izolovanih plazmida na agaroznom gelu i činjenicu da su ove bakterije dele prirodno stanište moguće, je da nose isti plazmid. Provera prisustva PKS gena je urađena i na izolovanim plazmidima ali oni nisu detektovani.



Slika 2.

PCR produkti fragmenta PKS gena sa genomске DNK sojeva A, B i C

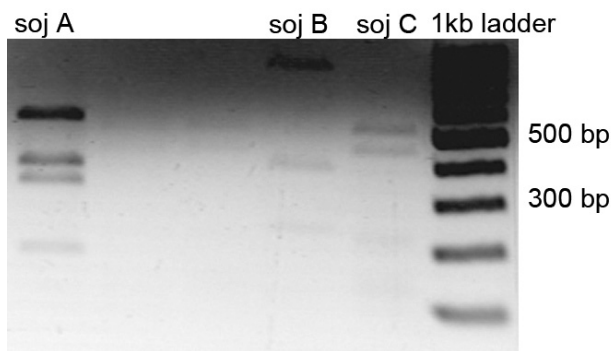
Figure 2. PCR products of PKS gene fragments with genome DNA strains A, B and C



Slika 3. Izolovane plazmidne DNK sojeva A, B i C

Figure 3. Isolated plasmid DNA strains A, B and C

Umnoženi su 16S rRNK geni sojeva A, B i C, deo PCR produkta je pušten u digestiju sa HhaI enzimom a deo sekvenciran (slika 4).



Slika 4. Restrikcioni profili sojeva A, B i C

Figure 4. Restrictive profiles of strains A, B and C

Dobijene su sekvence dela 16S rDNK od 729, 742 i 345 baznih parova za soj A, B i C respektivno (v. prilog) i korišćenjem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) algoritma upoređene sa već poznatim sekvencama. Sekvenciranje PKS gena nije uspešno urađeno.

Prema sekvenci 16S rRNK gena, soj A pripada rodu *Bacillus*, i najveću sličnost pokazuje sa sojevima *Bacillus cereus* TCB3 i TCB2 (100%). Pošto se zna da neki *Bacillus cereus* sojevi koriste PKS i NRPS (non-ribosomal peptide synthase) enzime da bi sintetisli antibiotik Zwittermicin A, može da se pretpostavi da PKS sa soja A ima sličnu funkciju, tačnije da dovodi do sinteze sličnog molekula (Donadio *et al.* 2007).

Rezultati BLAST analize 16S rDNK sojeva B i C su pokazali da su u pitanju nekultivisani sojevi.

Zaključak

U ovom radu su pronađena tri soja sa PKS genima označena A, B i C. Sekvenciranjem dela 16S rDNK je pokazano da su u pitanju tri različita soja, da soj A pripada rodu *Bacillus*, dok su sojevi B i C nekultivisani. Uzgajanjem na podlogama sa antibioticima je otkriveno da je soj A

rezistentan na ampicilin, soj B i na ampicilin i na eritromicin a soj C na eritromicin. Dokazano je prisustvo plazmida u sva tri soja, ali naši rezultati nisu pokazali da se na njima nalaze PKS geni.

Sa obzirom na veliku korist poliketida važno je nastaviti istraživanja povezana sa njima i enzimima koji učestvuju u njihovoj biosintezi. Zbog ubrzavanja procesa pronalazjenja bakterija koje proizvode poliketide korisno je proučavati do sada poznate sojeve da i sekvence njihovih PKS gena. Osim otkrivanja novih prirodnih poliketida, korišćenjem različitih metoda moguće je sintetisati nove. Jedna opcija je da se korišćenjem metoda organske sinteze dovede do željene modifikacije na molekulu. Međutim to nije uvek moguće zbog funkcionalne kompleksnosti poliketida i neprilagođenosti većine hemijskih metoda njihovom preciznom modifikovanju. Druga je da se korišćenjem različitih kombinacija PKS, početnih grupa, grupa za elongaciju i pomoćnih enzima sintetišu novi molekuli. Broj kombinacija se povećava zbog mogućnosti promene aminokiselinskih sekvenci katalitičkih domena enzima i korišćenja hibridnih enzima nastalih kombinovanjem modula sa različitih PKS. Sve te opcije povezane sa sintetičkim poliketidima dodaju na važnosti istraživanja povezanosti struktura, mehanizama i funkcija poliketida, PKS i pomoćnih enzima.

Sekvenciranjem fragmenta PKS gena tri izolovana soja bi mogla da se proveri povezanost sa već ispitivanim PKS. Detaljnije istraživanje bi obuhvatilo izolaciju i karakterizaciju poliketida koje sintetišu ti sojevi. Ukoliko se pokaže da su u pitanju dosad neotkriveni poliketidi trebala bi da se i proveri njihova fiziološka aktivnost.

Zahvalnost. Želeo bih da se zahvalim: Aleksandri Nikolić sa IMGGI na svoj pomoći i vođstvu tokom rada koji bez nje ne bi bio moguć; Aleksandri Vančevskoj koja mi je bila mentor i usmeravala me; Ivi Pruner na savetima i pažnji tokom rada u Petnici i pogotovo na velikoj pomoći tokom pisanja rada; Alekseju Drino koji mi je pomogao i pazio da ne napravim neku grešku tokom rada sa DNK u Petnici; Božidaru Radivojeviću na društvu i što me je poštedeo ulaska u Petničko jezero; Lidiji Đokić, Tanji Narančić i Sanji Bajkić iz Lab05 IMGGI na idejama i savetima tokom pripremanja za Petnicu; Laboratoriji 03 IMGGI što su mi omogućili da kod njih završim rad.

Literatura

- Weissman K. J. 2004. Polyketide biosynthesis: understanding and exploiting modularity. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, **362**: 2671.
- Savić M, Vasiljević B. 2006. Targeting polyketide synthase gene pool within actinomycetes: new degenerate primers. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **33**: 423

- Foerstner K. U., Doerks T., Creevey C. J., Doerks A., Bork P. 2008. A Computational Screen for Type I Polyketide Synthases in Metagenomics Shotgun Data. *PLoS ONE*, **3** (10): e3515. doi:10.1371/journal.pone.0003515Jill
- Cane D. E., Walsh C. T., Khosla C. 1998. Harnessing the Biosynthetic Code: Combinations, Permutations, and Mutations. *Science*, **282**: 63.
- Stinear T. P., Mve-Obiang A., Small P. L. C., Frigui W., Pryor M. J., Brosch R., Jenkin G. A., Johnson P. D. R., Davies J. K., Lee R. E., Adusumilli S., Garnier T., Haydock S. F., Leadlay P. F., Cole S. T. 2004. Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. *PNAS*, **101**: 1345.
- Clarridge III E. 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, **17**: 840.
- Marchesi J., Sato T., Weightman A., Martin T., Fry J., Hiom S., Wade W. 1998. Design And Evaluation Of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding For Bacterial 16s rRNA. *Applied And Environmental Microbiology*, **64**: 795.
- Donadio S., Monciardini P., Sosio M. 2007. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Natural Products Reports*, **24**: 1073.

Filip Ilić

Presence of PKS Genes in the Bacterial Population of Petnica Lake

Polyketide synthases (PKS) enable the synthesis of polyketides, a class of secondary metabolites that are widely applied, especially in medicine (antibiotics, immunosuppressants, anticancer drugs). Because of that it is of great importance to discover and study the characteristics of novel polyketides and the enzymes involved in their synthesis. From the bacteria found in the muck of the Petnica Lake it was shown that three strains carry PKS genes. Analysis of the obtained parts of the 16S rRNA gene sequence revealed that one of the strains belongs to the *Bacillus* genus, while the other two are uncultured bacteria. Further research should include the characterization of the PKS enzymes and polyketides produced by these three strains.

Prilog

Sekvence dela 16S rRNK gena

Soj A:

GAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC
ACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACC
GGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATT
GAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCA
TTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGT
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGC
TTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAG
TTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTT
AAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTG
GAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCA
TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGG
CGAAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGCGAAA
CGGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC

Soj B:

TGGGGATCTGCCAGTCGAGGGGGATCCCCGTTGGAAACGA
CTGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGGAGGGGACCTT
CGGGCCTTTCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGGATTAGCTAGTT
GGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTACTGAGACACGGTCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAAC
CCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTG
TAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGGCGCCTAATAC

Soj C:

GGGGTAAGAAATTTCCAGGGTGTAAGCGGTGAAAATGCGT
AGAGATTTTGAGGAAATACCGGAGGCGAAAGGCGGCCCCCCCT
GGACAAAAGACTGACGCTCAGGGTGCGAAAGGCGTGGGGAAGC
AAACAGGATTTAGATACCCTGGGTAGTCCACGCCCGTAAAACGA
TGTCGATTTGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTA
ACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA
ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT

GGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACA
TGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGAATCAG
AACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATG
TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCTTTGTTGCC
AGCACGTAATGGTGGGAACTCAAGGGAGACTGCCGGTGATAAAC
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGG
CCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCA
AGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAAAGAGTCGTAGTCCG
GATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGT
AATCGCGAATCAGAAGGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC

