



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 575 413

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01) C12N 15/53 (2006.01) C12P 7/16 (2006.01)

12 TRADUCCI

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 18.12.2008 E 13177890 (4)
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 09.03.2016 EP 2677028

(54) Título: Cetol-ácido reductoisomerasa que utiliza NADH

(30) Prioridad:

20.12.2007 US 15346 P 29.10.2008 US 109297 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 28.06.2016

(73) Titular/es:

BUTAMAX (TM) ADVANCED BIOFUELS LLC (100.0%)
Route 141 & Henry Clay, DuPont Experimental Station, Building 356
Wilmington, DE 19880-0356, US

(72) Inventor/es:

LI, YOUGEN; NELSON, MARK J.; LIAO, DER-ING y O'KEEFE, DANIEL P.

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

#### **DESCRIPCIÓN**

Cetol-ácido reductoisomerasa que utiliza NADH

Esta solicitud reivindica el beneficio de las aplicaciones provisionales de EE.UU. 61/015346, presentada el 20 de diciembre de 2007, y 61/109297 presentada 29 de octubre 2008.

#### 5 Campo de la invención

10

15

20

35

40

50

La invención se refiere a la evolución de proteínas. Específicamente, las enzimas cetol-ácido reductoisomerasa han evolucionado para utilizar el cofactor NADH en lugar del NADPH.

#### Antecedentes de la invención

Las enzimas cetol-ácido reductoisomerasa son de naturaleza ubicua y están involucradas en la producción de valina e isoleucina, rutas que pueden afectar a la síntesis biológica de isobutanol. El isobutanol se produce específicamente del catabolismo de L-valina como un subproducto de la fermentación de la levadura. Es un componente de "aceite de fusel" que se forma como resultado del metabolismo incompleto de los aminoácidos por las levaduras. Después de que el grupo amino de la L-valina se cosecha como fuente de nitrógeno, el α-ceto-ácido resultante es descarboxilado y se reduce a isobutanol por las enzimas de la ruta de Ehrlich (Dickinson, et al., J. Biol. Chem. 273, 25752-25756, 1998).

La adición de L-valina exógena para la fermentación aumenta el rendimiento de isobutanol, como se describe por Dickinson et al., supra, en donde se informa de que se obtiene un rendimiento de isobutanol de 3 g/l proporcionando L-valina en una concentración de 20 g/l en la fermentación. Además, se ha mostrado la producción de n-propanol, isobutanol y alcohol isoamílico mediante células de Zymomonas mobilis inmovilizadas en alginato de calcio (Oaxaca, et al., Acta Biotechnol., 11, 523-532, 1991).

Se mostraba un incremento en el rendimiento de alcoholes C3-C5 a partir de hidratos de carbono cuando se añadían los aminoácidos leucina, isoleucina y/o valina al medio de crecimiento como fuente de nitrógeno (WO 2005040392).

Mientras que los procedimientos descritos anteriormente indican el potencial de la producción de isobutanol a través de medios biológicos estos procedimientos tienen un coste prohibitivo para la producción de isobutanol escala industrial. La biosíntesis de isobutanol directamente a partir de azúcares sería económicamente viable y representaría un avance en la técnica. Sin embargo, hasta la fecha las únicas enzimas cetol-ácido reductoisomerasa (KARI) conocidas son aquellas que unen NADPH en su forma nativa, reduciendo la eficiencia energética de la ruta. Una KARI que uniera NADH sería beneficiosa y mejoraría la productividad de la ruta biosintética de isobutanol mediante la capitalización de la NADH producido por las rutas glucolíticas existentes y otras metabólicas en las células microbianas más habitualmente utilizadas. El descubrimiento de una enzima KARI que puede utilizar NADH como cofactor en lugar de NADPH sería un avance en la técnica.

La evolución de enzimas que tienen especificidad para el cofactor NADH en lugar de por el NADPH es conocida por algunas enzimas y se conoce normalmente como "intercambio/conmutación de cofactor". Véase, por ejemplo Eppink, et al. J. Mol. Biol., (1999), 292, 87-96, que describe la conmutación de la especificidad del cofactor de phidroxibenzoato hidroxilasa (PHBH) dependiente estrictamente de NADPH a partir de Pseudomonas fluorescens mediante mutagénesis dirigida al sitio; y Nakanishi, et al., J. Biol. Chem., (1997), 272, 2218-2222, que describe el uso de mutagénesis dirigida al sitio en una carbonilo reductasa de pulmón de ratón en la que Thr-38 fue sustituida por Asp (T38D) dando como resultado una enzima que tiene un aumento de 200 veces en los valores K<sub>m</sub> para NADP(H) y una disminución correspondiente de más de 7 veces en aquellos de NAD(H). La conmutación del cofactor de conmutación se ha aplicado a una variedad de enzimas que incluyen monooxigenasas (Kamerbeek, et al, Eur J, Biochem, (2004), 271, 2107-2116); deshidrogenasas; Nishiyama, et al., J. Biol. Chem, (1993), 268, 4656-4660; Ferredoxin-NADP reductasa, Martínez-Julvez, et al., Biophys. Chem, (2005), 115, 219-224); y oxidorreductasas (US2004/0248250).

Rane et al., (Arch. Biochem. Biophys., (1997), 338, 83-89) comentan la conmutación del cofactor de una cetol-ácido reductoisomerasa aislada de E. coli dirigiendo cuatro restos a la enzima para la mutagénesis (R68, K69, K75, y R76); sin embargo, se duda de la eficacia de este procedimiento.

Aunque los procedimientos citados anteriormente sugieren que es posible, por lo general, conmutar la especificidad del cofactor entre NADH y NADPH, los procedimientos son específicos de la enzima y los resultados impredecibles. El desarrollo de un cetol-ácido reductoisomerasa que tiene una alta especificidad por NADH en lugar de por NADPH mejoraría enormemente su eficacia en la ruta biosintética de isobutanol, sin embargo, no se ha informado de tal enzima KARI.

Los solicitantes han resuelto el problema planteado identificando una serie de enzimas cetol-ácido reductoisomerasa mutante que tienen una preferencia por unir NADH en lugar de NADPH.

#### Compendio de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para la evolución de enzimas de cetol-ácido reductoisomerasa (KARI) desde unir el cofactor NADPH hasta unir NADH. El procedimiento implica la mutagénesis de ciertos restos específicos en la enzima KARI de ellos para producir la conmutación del co-factor.

- 5 Por consiguiente, la invención proporciona una enzima cetol-ácido reductoisomerasa como se expone en la ID de SEC Nº: 17 en donde
  - a) el resto 52 se muta; o
  - b) los restos 47, 50 y 52 se mutan; o
- c) el resto 52 y al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en 24, 33, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170 se 10 mutan: o
  - d) los restos 47, 50, 52 y al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en 24, 33, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170 se mutan; y
  - en donde dicha enzima cetol-ácido reductoisomerasa tiene una preferencia por unir NADH en lugar de por NADPH, y
- 15 en donde dicha mutación es una sustitución de aminoácidos.

En una realización de dicha invención, la enzima comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la ID de SEC Nº: 29. También se describe en el presente documento una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la ID de SEC Nº: 29

Alternativamente, la invención proporciona una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la ID de SEC Nº: 19, 24, 25, 26, 27, 28, 67, 68, 69 y 70.

También se describe en el presente documento una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante como se expone en la ID de SEC Nº: 17 que comprende al menos una mutación en un resto seleccionado del grupo consistente en 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170.

En una realización específica, la invención proporciona una enzima cetol-ácido reductoisomerasa como se expone en la ID de SEC Nº: 17 en la que el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, G, H, N, y S.

En algunas realizaciones,

- a) el resto en la posición 47 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, F, G, I, L, N, P e Y;
- b) el resto en la posición 50 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, M, N, V y W; y
  - c) el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, G, H, N, y S.

En algunas realizaciones, en la enzima cetol-ácido reductoisomerasa de la invención

- a) el resto en la posición 156 tiene una sustitución de aminoácidos de V;
  - b) el resto en la posición 165 tiene una sustitución de aminoácidos de M;
  - c) el resto en la posición 61 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
  - d) el resto en la posición 170 tiene una sustitución de aminoácidos de A;
  - e) el resto en la posición 24 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
- 40 f) el resto en la posición 33 tiene una sustitución de aminoácidos de L;
  - g) el resto en la posición 80 tiene una sustitución de aminoácidos de I;
  - h) el resto en la posición 115 tiene una sustitución de aminoácidos de L; y
  - i) el resto en la posición 53 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, H, I y W.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para la evolución de una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que une NADPH a una forma que utiliza NADH que comprende:

- a) proporcionar una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que utiliza NADPH que tiene una secuencia de aminoácidos nativa específica:
- b) identificar un resto de conmutación del cofactor en la enzima de a) basado en la secuencia de aminoácidos de la enzima cetol-ácido reductoisomerasa Pseudomonas fluorescens como se expone en la ID de SEC Nº: 17 en la que el resto de conmutación del cofactor en la ID de SEC Nº: 17 está en la posición 52;
  - c) crear una mutación en el resto de conmutación del cofactor identificado en b) para crear una enzima mutante en la que dicha enzima mutante ligue NADH.
- También se describe en el presente documento un procedimiento para la evolución de una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que une NADPH a una forma que utiliza NADH que comprende:
  - a) proporcionar una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que utiliza NADPH que tiene una secuencia de aminoácidos nativa específica;
- b) identificar los restos de conmutación del cofactor en la enzima de a) basado en la secuencia de aminoácidos de la enzima cetol-ácido reductoisomerasa Pseudomonas fluorescens como se expone en la ID de SEC Nº: 17 en la que los restos de conmutación del cofactor están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170;
  - c) crear mutaciones en al menos uno de los restos de conmutación del cofactor de b) para crear una enzima mutante en la que dicha enzima mutante lique NADH.
- 20 En otra realización alternativa, la invención proporciona un procedimiento para la producción de isobutanol, que comprende:
  - a) proporcionar una célula anfitriona microbiana recombinante que comprende los siguientes constructos genéticos:
    - i) al menos un constructo genético que codifica una enzima acetolactato sintasa para la transformación de piruvato en acetolactato;
- 25 ii) al menos un constructo genético que codifica una enzima cetol-ácido reductoisomerasa de la invención;
  - iii) al menos un constructo genético que codifica una acetohidroxiácido deshidratasa para la transformación de 2,3-dihidroxiisovalerato en  $\alpha$ -cetoisovalerato (ruta de la etapa c);
  - iv) al menos un constructo genético que codifica una cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, para la transformación de  $\alpha$ -cetoisovalerato en isobutiraldehido (ruta de la etapa d);
  - v) al menos un constructo genético que codifica un alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada para la transformación de isobutiraldehido en isobutanol (ruta de la etapa e); y
  - b) cultivar la célula anfitriona de (a) en condiciones en las que se produzca iso-butanol.

### Breve descripción de las descripciones de las secuencias de las figuras

30

35

40

- La invención puede ser entendida más completamente a partir de la siguiente descripción detallada, las Figuras y las descripciones de las secuencias que se adjuntan, que forman parte de esta solicitud.
  - Figura 1 Muestra cuatro diferentes rutas de biosíntesis de isobutanol. Las etapas marcadas "a", "b", "c", "d", "e", "f", "g", "h", "i", "j" y "k" representan las transformaciones de substrato a producto que se describen a continuación.
- Figura 2 Alineamiento múltiple de secuencias (MSA) de enzimas KARI de diferentes fuentes. (a) MSA entre tres enzimas KARI que requieren NADPH; (b) MSA entre PF5-KARI y otras enzimas KARI, con especificidad promiscua de nucleótidos, donde MMC5 es de Methanococcus maripaludis C5; MMS2 es de Methanococcus maripaludis S2; MNSB es de Methanococcus vanniellii SB; ilv5 es de Saccharomyces cerevisiae ilv5; KARI-D1 es de Sulfolobus solfataricus P2 ilvC; KARI-D2 es de Pyrobaculum aerophilum P2ilvC; y KARI-S1 es de Ralstonia solanacearum GM11000 ivlC.
  - Figura 3 Interacción de bucle de unión fosfato con NADPH basado en el modelado de homología.
- Figura 4 Actividades KARI de mejor desempeño de la biblioteca C que utilizan cofactores NADH frente a NADPH. La actividad y la desviación estándar se derivaron de experimentos triples. La información de la mutación es la siguiente: C3A7 = R47Y/S50A/T52D/V53W; C3A10 = R47Y/S50A/T52D/V53W; C3B11 = R47F/S50A/T52D/V53W; C3C8 = R47G/S50M/T52D/V53W; y C4D12 = R47C/S50MT52DN53W

- Figura 5 (a) Actividades KARI de mejor desempeño de las bibliotecas E, F y G que utilizan cofactores NADH frente a NADPH. (b) actividades KARI de control positivo frente a Pf5-ilvC de tipo silvestre que utilizan cofactores NADH. La actividad y la desviación estándar se derivaron de al menos tres experimentos paralelos. "Wt" representa el tipo silvestre de Pf5-ilvC y "Neg" significa control negativo.
- 5 Los experimentos de las reacciones NADH y NADPH en (a) duraron 30 minutos; en (b) duraron 10 minutos.

15

- Figura 6 Actividades de mejor desempeño de la biblioteca H que utilizan cofactores NADH frente NADPH. La actividad y la desviación estándar se derivaron de experimentos triples. La información de la mutación es la siguiente: 24F9 = R47P/S50G/T52D; 68F10 = R47P/T52S; 83G10 = R47P/S50D/T52S; 39G4 = R47P/S50C/T52D; 91A9 = R47P/S50CT52D; y C3B11 = R47F/S50A/T52D/V53W
- Figura 7 Termoestabilidad de PF5-ilvC. La actividad restante de la enzima después de calentar a ciertas temperaturas durante 10 min era el número promedio de experimentos triples y se normalizó a la actividad medida a temperatura ambiente.
  - Figura 8 Alineamiento múltiple de secuencias entre 5 moléculas KARI que existen en la naturaleza. Las posiciones resaltadas en negrita y gris fueron identificados por PCR propensa a error y de las posiciones solo resaltadas en gris fueron objeto de mutagénesis.
  - Figura 9 Alineamiento de las veinticuatro secuencias KARI funcionalmente verificadas. El motivo GxGXX(G/A) involucrado en la unión de NAD(P)H se indica debajo del alineamiento.
  - Figura 10 Un ejemplo del alineamiento de Pf5-KARI Pseudomonas fluorescens para el perfil HMM de KARI. Las once posiciones que son responsables de conmutación del co-factor están en negrita y sombreadas en gris.
- Tabla 9-es una tabla del perfil HMM de las enzimas KARI descritas en el Ejemplo 5. Los once posiciones en el perfil HMM que representan las columnas en el alineamiento que corresponden a las once posiciones de conmutación del cofactor en Pf-5-KARI Pseudomonas fluorescens están identificadas como posiciones 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156 y 170. Las líneas correspondientes a estas posiciones en el archivo de modelo se resaltan en amarillo. La Tabla 9 se presenta adjunta electrónicamente.
- Las siguientes secuencias se ajustan a 37 C.F.R. 1.821-1.825 ("Requisitos para las solicitudes de patente que contienen secuencias de nucleótidos y/o divulgaciones de secuencias de aminoácidos las Reglas de Secuencias") y son compatibles con la Norma ST.25 (1998) de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (WIPO) y los requisitos del listado de secuencias de los de EPO y PCT (Reglas 5.2 y 49.5 (a-bis), y la Sección 208 y el Anexo C de las Instrucciones Administrativas). Los símbolos y formato utilizados para los datos de secuencias de nucleótidos y aminoácidos cumplen con las reglas establecidas en 37 CFR §1.822.

Tabla 1

Cebadores de oligonucleótidos utilizados en esta invención

	Cebadores de oligonucleótidos utilizados en esta invención			
ID de SECUENCIA No.	SECUENCIA	Descripción		
1	TGATGAACATCTTCGCGTATTCGCCGTCCT	Cebador inverso para el vector <i>pBAD</i>		
2	GCGTAGACGTGACTGTTGGCCTGNNTAAAGGCNN	Cebador directo de biblioteca C		
	GGCTNNCTGGGCCAAGGCT GAAGCCCACGGCTTG	Diblioteca C		
3	GCGTAGACGTGACTGTTGGCCTGNNTAAAGGCTCG	Cebador directo de biblioteca E		
	GCTACCGTTGCCAAGGCTGAAGCCCACGGCTTG	Dibiloteca E		
4	GCGTAGACGTGACTGTTGGCCTGCGTAAAGGCNNT	Cebador directo de biblioteca F		
	GCTACCGTTGCCAAGGCTGAAGCCCACGGCTTG	biblioteca F		
5	GCGTAGACGTGACTGTTGGCCTGCGTAAAGGCTCG	Cebador directo de biblioteca G		
	GCTNNTGTTGCCAAGGCTGAAGCCCACGGCTTG	biblioteca G		
6	GCGTAGACGTGACTGTTGGCCTGNNTAAAGGCNNT	Cebador directo de biblioteca H		
	GCTNNTGTTGCCAAGGCTGAAGCCCACGGCTTG			
7	AAGATTAGCGGATCCTACCT	Cebador de secuenciación		

	Cebadores de oligonucleótidos utilizados en esta invención			
ID de SECUENCIA No.	SECUENCIA	Descripción		
		(directo)		
8	AACAGCCAAGCTTTTAGTTC	Cebador de secuenciación (inverso)		
20	CTCTCTACTGTTTCTCCATACCCG	pBAD_266-021308f		
21	CAAGCCGTGGGCTTCAGCCTTGGCKNN	PF5_53Mt022908r		
22	CGGTTTCAGTCTCGTCCTTGAAG	pBAD_866-021308		
49	GCTCAAGCANNKAACCTGAAGG	pBAD-405-C33_090808f		
50	CCTTCAGGTTKNNTGCTTGAGC	pBAD-427-C33_090808r		
51	GTAGACGTGNNKGTTGGCCTG	pBAD-435-T43_090808f		
52	CAGGCCAACKNNCACGTCTAC	pBAD-456-T43_090808r		
53	CTGAAGCCNNKGGCNNKAAAGTGAC	pBAD-484- H59L61_090808f		
54	GTCACTTTKNNGCCKNNGGCTTCAG	pBAD-509- H59L61_090808r		
55	GCAGCCGTTNNKGGTGCCGACT	pBAD-519-A71_090808f		
56	AGTCGGCACCKNNAACGGCTGC	pBAD-541-A71_090808r		
57	CATGATCCTGNNKCCGGACGAG	pBAD-545-T80_090808f		
58	CTCGTCCGGKNNCAGGATCATG	pBAD-567-T80_090808r		
59	CAAGAAGGGCNNKACTCTGGCCT	pBAD-608-A101_090808f		
60	AGGCCAGAGTKNNGCCCTTCTTG	pBAD-631-A101_090808r		
61	GTTGTGCCTNNKGCCGACCTCG	pBAD-663-R119_090808f		
62	CGAGGTCGGCKNNAGGCACAAC	pBAD-685-R119_090808r		

Las secuencias adicionales utilizadas en la aplicación se enumeran a continuación. En esta divulgación se utilizan los nombres abreviados de los genes entre paréntesis.

- ID de SEC Nº: 9: Methanococcus maripaludis C5-ilvC (MMC5) Número de Acceso al Banco de Genes NC 009135.1 Región: 901034..902026
- 5 ID de SEC Nº: 10: es la Methanococcus maripaludis S2-ilvC (MMS2) Número de Acceso al Banco de Genes NC 005791.1 Región: 645729..646721
  - ID de SEC  $N^\circ$ : 11: es la Methanococcus vannielii SB-ilv5 (MVSB) Número de Acceso al Banco de Genes  $NZ_AAWX01000002.1$  Región: 302214..303206
- ID de SEC Nº: 12: es la Saccharomyces cerevisiae ilv5 (ilv5) Número de Acceso al Banco de Genes NC\_001144.4 10 Región: 838065..839252
  - ID de SEC Nº: 13: es la Sulfolobus solfataricus P2 ilvC (KARI-D1) Número de Acceso al Banco de Genes NC\_002754.1 Región: 506253..507260
  - ID de SEC N°: 14: es la Pyrobaculum aerophilum str. IM2 ilvC (KARI-D2) Número de Acceso al Banco de Genes NC\_003364.1 Región: 1976281..1977267
- 15 ID de SEC Nº: 15: es la Ralstonia solanacearum GMI1000 ilvC (KARI-S1) Número de Acceso al Banco de Genes NC 003295.1 Región: 2248264..2249280
  - ID de SEC Nº: 16: es la Pseudomonas aeruginosa PAO1 ilvC Número de Acceso al Banco de Genes NC\_002516 Región: 5272455..5273471
- ID de SEC Nº: 17: es la Pseudomonas fluorescens PF5 ilvC Número de Acceso al Banco de Genes NC\_004129 20 Región: 6017379..6018395

- ID de SEC Nº: 18: es la Spinacia oleracea ilvC (Spinach-KARI) Número de Acceso al Banco de Genes NC\_002516 Región: 1..2050.
- ID de SEC Nº: 19: es la secuencia de aminoácidos del mutante (Y24F/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/G170A) de la proteína nativa ilvC de Pseudomonas fluorescens.
- 5 SEQ ID NO: 23 es la SEC de ADN del mutante (Y24F/R47Y/S50A/ T52D/V53A/L61 F/ G170A) de la proteína nativa ilvC de Pseudomonas fluorescens.
  - ID de SEC Nº: 24: es la SEC de aminoácidos de la ZB1 mutante (Y24F/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61 F/A156V)
  - ID de SEC Nº: 25: es la SEC de aminoácidos de la ZF3 mutante (Y24F/C33L/R47YIS50A/T52D/V53A/L61F)
  - ID de SEC Nº: 26: es la SEC de aminoácidos de la ZF2 mutante (Y24F/C33L/R47Y/S50AIT52D/V53A/L61 F/A156V)
- 10 ID de SEC №: 27: es la SEC de aminoácidos de la ZB3 mutante (Y24F/C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/G170A)
  - ID de SEC Nº: 28: es la SEC de aminoácidos del Z4B8 mutante (C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A1L61F/T801IA156V/G170A)
  - ID de SEC N°: 29: es una secuencia de aminoácidos de consenso que comprende todas las mutaciones puntuales KARI verificadas experimentalmente basadas en la ID de SEC N°: 17.
- 15 ID de SEC №: 30: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Natronomonas pharaonis DSM 2160
  - ID de SEC Nº: 31: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168
  - ID de SEC Nº: 32: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Corynebacterium glutamicum ATCC 13032
  - ID de SEC Nº: 33: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Phaeospirilum molischianum
  - ID de SEC Nº: 34: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4
- 20 ID de SEC N°: 35: es la secuencia de aminoácidos para KARI Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1
  - ID de SEC Nº: 36: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Campylobacter lari RM2100
  - ID de SEC Nº: 37: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Marinobacter aquaeolei VT8
  - ID de SEC Nº: 38: es la secuencia de aminoácidos para KARI Psychrobacter arcticus 273-4
  - ID de SEC Nº: 39: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Hahella chejuensis KCTC2396
- 25 ID de SEC Nº: 40: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Thiobacillus denitrificans ATCC25259
  - ID de SEC Nº: 41: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Azotobacter vinelandii AvOP
  - ID de SEC Nº: 42: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Pseudomonas syringae pv. syringae B728a
  - ID de SEC Nº: 43: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000
  - ID de SEC Nº: 44: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Pseudomonas putida KT2440
- 30 ID de SEC №: 45: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Pseudomonas entomophila L48
  - ID de SEC Nº: 46: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Pseudomonas mendocina ymp
  - ID de SEC Nº: 47: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Bacillus cereus ATCC10987 NP 977840.1
  - ID de SEC Nº: 48: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Bacillus cereus ATCC10987 NP 978252.1
- ID de SEC Nº: 63: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Escherichia coli-Número de Acceso al Banco de Genes P05793
  - ID de SEC N°: 64: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Marine Gamma Proteobacterium HTCC2207 Número de Acceso al Banco de Genes  $ZP_01224863.1$
  - ID de SEC Nº: 65: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Desulfuromonas acetoxidans Número de Acceso al Banco de Genes ZP\_01313517.1
- 40 ID de SEC Nº: 66: es la secuencia de aminoácidos para KARI de Pisum sativum (Pea) Número de Acceso al Banco de Genes 082043

- ID de SEC Nº: 67: es la secuencia de aminoácidos para el mutante 3361 G8 (C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/T80I)
- ID de SEC N°: 68: es la secuencia de aminoácidos del 2H10 mutante (Y24F/C33L/R47Y/S50A/T52D/V53I/L61F/T80I/A156V)
- 5 ID de SEC N°: 69: secuencia de aminoácidos del 1 D2 mutante es la (Y24F/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/T801/A156V
  - ID de SEC  $N^{\circ}$ : 70: es la secuencia de aminoácidos del 3F12 mutante (Y24F/C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/T801/A156V).

#### Descripción detallada de la invención

50

- La presente invención se refiere a la generación de enzimas KARI mutadas para usar NADH en lugar de NADPH. Estas enzimas de co-factor conmutado funcionan de manera más eficaz en los sistemas microbianos diseñados para producir isobutanol. Isobutanol es un importante producto químico industrial de entre los productos básicos con una variedad de aplicaciones, donde su potencial como un combustible o un aditivo de combustible es particularmente significativo. Aunque sólo un alcohol de cuatro carbonos, butanol tiene un contenido de energía similar al de la gasolina y se puede mezclar con cualquier combustible fósil. Isobutanol está favorecido como un combustible o un aditivo del combustible, ya que produce sólo CO<sub>2</sub> y poco o ningún SO<sub>X</sub> o NO<sub>X</sub> cuando se quema en un motor estándar de combustión interna. Además el butanol es menos corrosivo que el etanol, el aditivo de combustible más preferido hasta la fecha.
- Las siguientes definiciones y abreviaturas se han de utilizar para la interpretación de las reivindicaciones y de la memoria descriptiva.
  - El término "invención" o la expresión "presente invención" como se utiliza en el presente documento está destinado a aplicarse en general a todas las realizaciones de la invención descritas en las reivindicaciones como presentadas o más tarde modificadas y complementadas, o en la memoria descriptiva.
- La expresión "ruta biosintética del isobutanol" se refiere a la ruta enzimática para producir isobutanol. Rutas biosintéticas de isobutanol preferidas se ilustran en la Figura 1 y se describen en el presente documento.
  - La expresión "ensayo de consumo de NADPH" se refiere a un ensayo enzimático para la determinación de la actividad específica de la enzima KARI, que implica medir la desaparición del cofactor KARI, NADPH, de la reacción enzimática.
  - "KARI" es la abreviatura de la enzima cetol-ácido reductoisomerasa.
- La expresión "proximidad cercana" cuando se refiere a la posición de diversos restos de aminoácidos de una enzima KARI con respecto al adenosil 2'-fosfato de NADPH significa aminoácidos en el modelo tridimensional para la estructura de la enzima que se encuentran a unos 4,5 Å del átomo de fósforo del adenosil 2'-fosfato de NADPH ligado a la enzima.
- La expresión "Cetol-ácido reductoisomerasa " (abreviado "KARI"), y "Acetohidroxiácido isomerorreductasa" se utilizarán de forma intercambiable y se refieren a la enzima que tiene el número de la CE, EC 1.1.1.86 (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego). La cetol-ácido reductoisomerasa cataliza la reacción de (S)-acetolactato a 2,3-dihidroxiisovalerato, como se describe más completamente a continuación. Estas enzimas están disponibles a partir de una serie de fuentes, que incluyen, pero no se limitan a E. coli con Número de Acceso al Banco de Genes NC-000913 REGIÓN: 3955993..3957468, Vibrio cholerae con Número de Acceso al Banco de Genes NC-002505 REGIÓN: 157441..158925, Pseudomonas aeruginosa con Número de Acceso al Banco de Genes NC-002516, (ID de SEC Nº: 16) REGIÓN: 5272455..5273471, y Pseudomonas fluorescens con Número de Acceso al Banco de Genes NC-004129 (ID de SEC Nº: 17) REGIÓN: 6017379..6018395. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "enzima cetol-ácido reductoisomerasa de Clase I" significa la forma corta que tiene típicamente entre 330 y 340 restos de aminoácidos, y es distinta de la forma larga, llamada clase II, que tiene típicamente aproximadamente 490 restos.
  - La expresión "acetolactato sintasa" se refiere a una enzima que cataliza la transformación de piruvato en acetolactato y CO<sub>2</sub>. Acetolactato tiene dos estereoisómeros ((R)- y (S)-); la enzima prefiere el (S)-isómero, que se produce mediante sistemas biológicos. Acetolactato sintasas preferidas son conocidas por el número EC 2.2.1.6 9 (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego). Estas enzimas están disponibles a partir de una serie de fuentes, que incluyen, pero no se limitan a Bacillus subtilis (N° en el Banco de Genes: CAB15618, Z99122, secuencia de aminoácidos NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) y secuencia de nucleótidos NCBI, respectivamente), Klebsiella pneumoniae (N° en el Banco de Genes: AAA25079 (ID de SEC N°: 2), M73842 (ID de SEC N°: 1)), y Lactococcus lactis (N° en el Banco de Genes: AAA25161, L16975).
  - La expresión "acetohidroxiácido deshidratasa" se refiere a una enzima que cataliza la transformación de 2,3-

dihidroxi-isovalerato a  $\alpha$ -cetoisovalerato. Las acetohidroxiácido deshidratasas preferidas son conocidas por el número EC 4.2.1.9. Estas enzimas están disponibles a partir de en una amplia variedad de microorganismos, que incluyen, pero no se limitan a E. coli (Nº en el Banco de Genes: YP\_026248, NC\_000913, S. cerevisiae (Nº en el Banco de Genes: NP\_012550, NC\_001142), M. maripaludis (Nº en el Banco de Genes: CAF29874, BX957219), y B. subtilis (Nº en el Banco de Genes: CAB14105, Z99115).

5

10

15

30

35

40

La expresión " $\alpha$ -cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada" se refiere a una enzima que cataliza la transformación de  $\alpha$ -cetoisovalerato a isobutiraldehido y CO $_2$ . Las  $\alpha$ -cetoácido descarboxilasas de cadena ramificada preferidas son conocidas por el número EC 4.1.1.72 y están disponibles a partir de una serie de fuentes, que incluyen, pero no se limitan a Lactococcus lactis (N $^\circ$  en el Banco de Genes: AAS49166, AY548760; CAG34226, AJ746364, Salmonella typhimurium (N $^\circ$  en el Banco de Genes: NP-461346, NC-003197), y Clostridium acetobutylicum (N $^\circ$  en el Banco de Genes: NP-149189, NC-001988).

La expresión "alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada" se refiere a una enzima que cataliza la transformación de isobutiraldehido a isobutanol. Las alcohol deshidrogenasas de cadena ramificada preferidas son conocidas por el número EC 1.1.1.265, pero también pueden ser clasificadas bajo otras alcohol deshidrogenasas (específicamente, EC 1.1.1.1 o 1.1.1.2). Estas enzimas utilizan NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducida) y/o NADPH como donante de electrones y están disponibles a partir de una serie de fuentes, que incluyen, pero no se limitan a S. cerevisiae (Nº en el Banco de Genes: NP-010656, NC-001136; NP-014051, NC-001145), E. coli (Nº en el Banco de Genes: NP-417484, y C. acetobutylicum (Nº en el Banco de Genes: NP-349892, NC-003030).

La expresión "ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada" se refiere a una enzima que cataliza la transformación de α-cetoisovalerato a isobutiril-CoA (isobutiril-cofactor A), utilizando NAD<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleótido) como aceptor de electrones. Las cetoácido deshidrogenasas de cadena ramificada preferidas son conocidas por el número EC 1.2.4.4. Estas cetoácido deshidrogenasas de cadena ramificada comprenden cuatro subunidades, y las secuencias de todas las subunidades están disponibles en una amplia variedad de microorganismos, que incluyen, pero no se limitan a B. subtilis (N° en el Banco de Genes: CAB14336, Z99116;
 CAB14335, Z99116; CAB14334, Z99116, y CAB14337, Z99116) y Pseudomonas putida (N° en el Banco de Genes: AAA65614, M57613; AAA65615, M57613; AAA65617, M57613, y AAA65618, M57613).

Los términos " $k_{cat}$ " y " $K_m$ " son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en Enzyme estructure and Mechanism,  $2^a$  ed. (Ferst; W.H. Freeman: NY, 1985; pág. 98-120). La expresión " $k_{cat}$ ", a menudo llamado el "número de rotación", se define como el número máximo de moléculas de substrato transformadas a productos por sitio activo por unidad de tiempo, o el número de veces que la enzima da la vuelta por unidad de tiempo. kcat = Vmax/[E], donde [E] es la concentración de la enzima (Ferst, supra). Los términos "rotación total" y "número de rotación total" se utilizan en el presente documento para referirse a la cantidad de producto formado por la reacción de una enzima KARI con substrato.

La expresión "eficiencia catalítica" se define como la k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> de una enzima. La eficiencia catalítica se utiliza para cuantificar la especificidad de una enzima por un substrato.

La expresión "molécula de ácido nucleico aislada", "fragmento de ácido nucleico aislado" y "construcción genética" se usan de forma intercambiable y significará un polímero de ARN o ADN que es monocatenario o bicatenario, que contiene opcionalmente, bases de nucleótidos sintéticas, no natural o alteradas. Un fragmento de ácido nucleico aislado en forma de un polímero de ADN puede estar compuesto de uno o más segmentos de ADNc, ADN genómico o ADN sintético.

El término "aminoácido" se refiere a la unidad estructural química básica de una proteína o polipéptido. Las siguientes abreviaturas se usan en el presente documento para identificar aminoácidos específicos:

Aminoácido	Abreviaturas de tres letras	Abreviaturas de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	С
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	Su	Н
Leucina	Leu	L

Aminoácido	Abreviaturas de tres letras	Abreviaturas de una letra
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	Р
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	Т
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Υ
Valina	Val	V

El término "Gen" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que es capaz de ser expresado como una proteína específica, incluyendo opcionalmente secuencias reguladoras que preceden (secuencias 5' no codificantes) y que siguen (secuencias 3' no codificantes) a la secuencia codificante. "Gen nativo" se refiere a un gen tal como se encuentra en la naturaleza con sus propias secuencias reguladoras. "Gen quimérico" se refiere a cualquier gen que no es un gen nativo, que comprende secuencias reguladoras y codificantes que no se encuentran juntas en la naturaleza. Por consiguiente, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que se derivan de diferentes fuentes, o secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente que la encontrada en la naturaleza. "Gen endógeno" se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen "foráneo" se refiere a un gen que no se encuentra normalmente en el organismo anfitrión, pero que se introduce en el organismo anfitrión por transferencia génica. Los genes foráneos pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos. Un "transgén" es un gen que ha sido introducido en el genoma por un procedimiento de transformación.

10

15

20

25

30

35

45

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "Secuencia codificante" se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia específica de aminoácidos. "Secuencias reguladoras adecuadas" se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas aguas arriba (secuencias 5' no codificantes), dentro de, o aguas abajo (secuencias 3' no codificantes) de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, en el procesamiento del ARN o en la estabilidad, o en la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de traducción, intrones, secuencias de reconocimiento de poliadenilación, sitio de procesamiento del ARN, sitio de unión efector y estructura de bucle en horquilla.

La expresión "Promotor" se refiere a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. En general, una secuencia codificante se encuentra en 3' a una secuencia promotora. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintéticos. Los expertos en la técnica entenderán que promotores diferentes pueden dirigir la expresión de un gen en tejidos o tipos de células diferentes, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales o fisiológicas. Los promotores que causan que un gen se exprese en la mayoría de los tipos de células en la mayoría de veces se denominan comúnmente "promotores constitutivos". Se reconoce además que, dado que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no han sido completamente definidos, fragmentos de ADN de diferentes longitudes puedan tener idéntica actividad promotora.

La expresión "unido operativamente" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de modo que la función de una se ve afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificante cuando es capaz de efectuar la expresión de esa secuencia codificante (es decir, que la secuencia codificante está bajo el control de la transcripción del promotor). Las secuencias codificantes pueden unirse operativamente a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido.

El término "expresión", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la transcripción y acumulación estable de derivados de ARN sentido (ARNm) o ARN antisentido derivados del fragmento de ácido nucleico de la invención. Expresión también puede referirse a la traducción de ARNm en un polipéptido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico en el genoma de un organismo anfitrión, dando como resultado una herencia genéticamente estable. Organismos anfitrión que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos "transgénicos" o "recombinantes" o "transformados".

Los términos "plásmido", "vector" y "casete" se refieren a un elemento cromosómico extra que llevan a menudo genes que no son parte del metabolismo central de la célula, y habitualmente en forma de fragmentos de ADN

circulares de doble cadena. Tales elementos pueden ser secuencias de replicación autónoma, secuencias que se integran en el genoma, fago o secuencias de nucleótidos, lineales o circulares, de un ADN o ARN monocatenario o bicatenario, derivadas de cualquier fuente, en el que una serie de secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una única construcción que es capaz de introducir un fragmento promotor y la secuencia de ADN en un producto génico seleccionado junto con la secuencia no traducida 3' apropiada en una célula. "Casete de transformación" se refiere a un vector específico que contiene un gen foráneo y que tiene elementos, además del gen foráneo, que facilitan la transformación de una célula anfitriona particular. "Casete de expresión" se refiere a un vector específico que contiene un gen foráneo y que tiene elementos, además del gen foráneo, que permiten una realzada expresión de ese gen en un anfitrión foráneo.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "Degeneración del codón" se refiere a la naturaleza en el código genético que permite la variación de la secuencia de nucleótidos sin afectar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado. El experto en la materia es muy consciente del "sesgo del codón" exhibido por una célula anfitriona específica en el uso de codones de nucleótidos para especificar un aminoácido dado. Por lo tanto, cuando se sintetiza un gen para mejorar la expresión en una célula anfitriona, es deseable diseñar el gen de manera que su frecuencia de uso de codón se aproxime a la frecuencia de uso del codón preferida de la célula anfitriona.

La expresión "optimizado del codón" que se refiere a genes o regiones codificantes de moléculas de ácido nucleico para la transformación de diversos anfitriones, se refiere a la alteración de los codones en el gen o regiones codificantes de las moléculas de ácido nucleico para reflejar el uso de codones típico del organismo anfitrión sin alterar el polipéptido codificado por el ADN.

Técnicas estándar de ADN recombinante y de clonación molecular utilizadas en el presente documento son bien conocidas en la técnica y son descritas por Sambrook et al. (Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) (en adelante "Maniatis"); y por Silhavy et al. (Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY, 1984); y por Ausubel, F.M. et al., (Current Protocols in Molecular Biology, publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience, 1987).

La presente invención se refiere a una necesidad que surge en la producción microbiana de isobutanol, donde la enzima cetol-ácido reductoisomerasa desempeña una función vital. Las enzimas cetol-ácido reductoisomerasa de tipo silvestre normalmente utilizan NADPH como su cofactor. Sin embargo, en la formación de isobutanol un exceso de NADH se produce por rutas metabólicas auxiliares. La invención proporciona enzimas KARI de Clase I mutantes que han evolucionado para utilizar NADH como cofactor, superando el problema del cofactor y aumentando la eficiencia de la ruta biosintética de isobutanol.

La producción de isobutanol utiliza la ruta de la glucólisis presente en el organismo anfitrión. Durante la producción de dos moléculas de piruvato a partir de glucosa durante la glucólisis, existe una producción neta de dos moléculas de NADH a partir de NAD<sup>+</sup> por la reacción de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Durante producción posterior de una molécula de isobutanol a partir de dos moléculas de piruvato, existe consumo neto de una molécula de NADPH, por la reacción de la KARI, y una molécula de NADH por la reacción de isobutanol deshidrogenasa. La reacción global de la glucosa a isobutanol conduce así a la producción neta de una molécula de NADH y al consumo neto de una molécula de NADPH. La intertransformación de NADH con NADPH es generalmente lenta e ineficiente; por ello, el NADPH consumido se genera por el metabolismo (por ejemplo, por la ruta del fosfato de pentosa) que consume substrato en el proceso. Mientras tanto, la célula se esfuerza por mantener la homeostasis en la relación NAD+/NADH, lo que lleva al exceso de NADH producido en la producción de isobutanol siendo consumido en la reducción excesiva de otros intermediarios metabólicos; p. ej., mediante la producción de lactato a partir de piruvato. Por ello, el deseguilibrio entre NADH producido y NADPH consumido por la ruta de isobutanol conduce a una reducción en el rendimiento molar de isobutanol producido a partir de la glucosa de dos maneras: 1) la operación innecesaria de metabolismo para producir NADPH, y 2) reacción excesiva de intermedios metabólicos para mantener homeostasis de NAD<sup>+</sup>/NADH. La solución a este problema consiste es inventar una KARI que sea específica de NADH como su cofactor, de modo que ambas moléculas de NADH producidas en la glucólisis sean consumidas en la síntesis de isobutanol a partir de piruvato.

Enzimas de Cetol-ácido reductoisomerasa (KARI)

5

30

35

40

45

- Acetohidroxiácido isomerorreductasa o cetol-ácido reductoisomerasa (KARI; EC 1.1.1.86) cataliza dos etapas en la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada y es una enzima clave en su biosíntesis. KARI se encuentra en diversos organismos y las comparaciones de las secuencias de aminoácidos entre especies han revelado que existen 2 tipos de esta enzima: una forma corta (clase I) que se encuentra en los hongos y en la mayoría de las bacterias, y una forma larga (clase II) típica de las plantas.
- Las KARI Clase I tienen típicamente entre 330-340 restos de aminoácidos. Las enzimas KARI de forma larga tienen alrededor de 490 restos de aminoácidos. Sin embargo, algunas bacterias tales como Escherichia coli poseen una forma larga, en donde la secuencia de aminoácidos difiere apreciablemente de la que se encuentra en las plantas. KARI está codificada por el gen ilvC y es una enzima esencial en el crecimiento de E. coli y otras bacterias en un medio mínimo. Típicamente KARI utiliza NADPH como cofactor y requiere un catión divalente tal como Mg<sup>++</sup> para su

actividad. Además de utilizar acetolactato en la ruta valina, KARI también transforma acetohidroxibutanoato a dihidroximetilpentanoato en la ruta de producción de isoleucina.

Las KARI de Clase II consisten, generalmente en un dominio N-terminal del resto 225 y un dominio C-terminal de resto 287. El dominio N-terminal, que contiene el sitio de unión NADPH, tiene una estructura  $\alpha/\beta$  y se asemeja a los dominios encontrados en otras oxidorreductasas dependientes de piridina nucleótidos. El dominio C-terminal consiste casi en su totalidad de  $\alpha$ -hélices y es de una topología previamente desconocida.

La estructura cristalina de la enzima KARI de E. Coli a 2,6 Å de resolución ha sido resuelta (Tyagi, et al., Protein Science, 14, 3089-3100, 2005). Esta enzima consiste en dos dominios, uno con estructura mixta  $\alpha/\beta$  que es similar a la encontrada en otras deshidrogenasas dependientes de piridina nucleótidos. El segundo dominio es principalmente  $\alpha$ -helicoidal y muestra una fuerte evidencia de la duplicación interna. La comparación de los sitios activos de KARI de E. Coli, Pseudomonas aeruginosa, y espinaca mostraba que la mayoría de los restos en el sitio activo de la enzima ocupan posiciones conservadas. Mientras que la KARI de E. Coli se cristalizaba como un tetrámero, que es probablemente la unidad probable biológicamente activa, la KARI P. aeruginosa (Ahn, et al., J. Mol. Biol., 328, 505-515, 2003) formaba un dodecámero y la enzima de la espinaca formaba un dímero. Las KARI conocidas son enzimas lentas con un número de rotación informado ( $k_{cat}$ ) de 2 s<sup>-1</sup> (Aulabaugh et al.; Biochemistry, 29, 2824-2830, 1990) o 0,12 s<sup>-1</sup> (Rane et al., Arch. Biochem. Biophys. 338, 83-89, 1997) para acetolactato. Los estudios han demostrado que el control genético de la biosíntesis de isoleucina-valina en E. coli es diferente de aquella en la Ps. aeruginosa (Marinus, et al., Genetics, 63, 547-56, 1969).

Identificación de sitios diana de aminoácidos para la conmutación del cofactor

5

10

15

35

Se informó que los átomos de oxígeno del fosfato p2' del NADPH forman enlaces de hidrógeno con cadenas laterales de Arg162, Ser165 y Ser167 de la KARI de la espinaca (Biou V. et al The EMBO Journal, 16: 3405-3415, 1997). Se realizaron múltiples alineamientos de secuencias, utilizando el vector NTI (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA), con enzimas KARI de la espinaca, Pseudomonas aeruginosa (PAO-KARI) y Pseudomonas fluorescens (PF5-KARI). Los sitios de unión de NADPH se muestran en la Figura 2a. Los aminoácidos arginina, treonina y serina parecen desempeñar funciones similares en la formación de enlaces de hidrógeno con los átomos de oxígeno de fosfato p2' de NADPH en las enzimas de la KARI. Los estudios de Ahn et al (J. Mol Biol, 328: 505-515, 2003) habían identificado tres sitios de unión de fosfato de NADPH (Arg47, Ser50 y Thr52) para Pseudomonas aeruginosa (PAO-KARI) después de comparar su estructura con la de la KARI de la espinaca. Tomando como hipótesis que estos tres sitios de unión de fosfato de NADPH de las tres enzimas KARI utilizadas en la divulgación se conservaran, Arg47, Ser50 y Thr52 de PF5-KARI fueron direccionados como los sitios de unión fosfato para esta enzima. Esta hipótesis se confirmó, además, a través del modelado de homología.

También se realizóalineamiento múltiple de secuencias entre PF5-ilvC y varias otras enzimas KARI con especificidad de nucleótidos promiscua. Como se muestra en la Figura 2b, los aminoácidos de glicina (G50) y triptófano (W53), en otras enzimas KARI en la Figura 2b, siempre aparecen juntos como un par en las secuencias de aquellas enzimas. Se asumió, por lo tanto, que el resto voluminoso de triptófano 53 era importante en la determinación de la especificidad del nucleótido reduciendo el tamaño del bolsillo de unión de nucleótidos para favorecer al nucleótido más pequeño, NADH. La posición 53 de PF5-ilvC fue, por lo tanto, elegida como diana para la mutagénesis.

Varias genotecas de saturación del sitio se prepararon conteniendo genes que codifican enzimas KARI mediante los kits comercialmente disponibles para la generación de mutantes. Los clones de cada biblioteca fueron cribados en cuanto a la actividad KARI mejorada utilizando el ensayo de consumo de NADH descrito en el presente documento. El cribado dio como resultado la identificación de una serie de genes que tienen mutaciones que se pueden correlacionar con la actividad KARI. La ubicación de las mutaciones se identificaron utilizando la secuencia de aminoácidos de la proteína PF5 ilvC Pseudomonas fluorescens (ID de SEC Nº: 17). Los mutantes que tienen actividad KARI mejorada eran las que tenían mutaciones en las siguientes posiciones: 47, 50, 52 y 53. Las mutaciones más específicamente deseables incluían las siguientes sustituciones:

- a) el resto en la posición 47 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, F, G, I, L, N, P e Y;
- b) el resto en la posición 50 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, 50 E, F, G, M, N, V, W;
  - c) el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, G, H, N, S:
  - d) el resto en la posición 53 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, H, I, W:
- En otra realización, la mutagénesis adicional, utilizando PCR propensa a error, realizada en los mutantes enumerados anteriormente identificó posiciones de mutación como: 156, 165, 61, 170, 115 y 24. Más específicamente los mutantes deseables con menor K<sub>m</sub> para NADH contenía las siguientes sustituciones:

- e) el resto en la posición 156 tiene una sustitución de aminoácidos de V;
- f) el resto en la posición 165 tiene una sustitución de aminoácidos de M;
- g) el resto en la posición 61 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
- h) el resto en la posición 170 tiene una sustitución de aminoácidos de A;
- 5 i) el resto en la posición 24 tiene una sustitución de aminoácidos de F; y
  - j) el resto en la posición 115 tiene una sustitución de aminoácidos de L.

En trabajos adicionales, se realizó el alineamiento múltiple de secuencias de PF5-ilvC Pseudomonas fluorescens, de ilvC1 y livC2 Bacillus cereus y de KARI de espinacas que permitió la identificación de las posiciones 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 156 y 170 para posterior mutagénesis. Más específicamente, se obtuvieron mutantes con mucha menor Km para NADH. Estas mutaciones también se basan en la enzima KARI de Pseudomonas fluorescens, (ID de SEC Nº: 17) como una secuencia de referencia en la que la secuencia de referencia comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:

- k) el resto en la posición 24 tiene una sustitución de aminoácidos de fenilalanina;
- I) el resto en la posición 50 tiene una sustitución de aminoácidos de alanina;
- m) el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos de ácido aspártico;
  - n) el resto en la posición 53 tiene una sustitución de aminoácidos de alanina;
  - o) el resto en la posición 61 tiene una sustitución de aminoácidos de fenilalanina;
  - p) el resto en la posición 156 tiene una sustitución de aminoácidos de valina;
  - q) el resto en la posición 33 tiene una sustitución de aminoácidos de leucina;
  - r) el resto en la posición 47 tiene una sustitución de aminoácidos de tirosina;
    - s) el resto en la posición 80 tiene una sustitución de aminoácidos de isoleucina;

У

20

40

45

10

- t) el resto en la posición 170 tiene una sustitución de aminoácidos de la alanina.
- La presente invención incluye un polipéptido mutante que tiene actividad KARI, teniendo dicho polipéptido una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la ID de SEC Nº: 24, 25, 26, 27 y 28.

Una secuencia de consenso para el ilvC mutante era generada a partir del alineamiento múltiple de secuencias y se proporciona como ID de SEC Nº: 29 que representa todas las mutaciones verificadas experimentalmente de la enzima KARI basadas en la secuencia de aminoácidos de la enzima KARI aislada de Pseudomonas fluorescens, (ID de SEC Nº: 17)

Además la presente invención describe posiciones de mutación identificadas utilizando un perfil de Modelo Oculto de Markov (HMM) construido basado en secuencias de 25 enzimas KARI Clase I y Clase II funcionalmente verificadas. El perfil HMM identificó las posiciones de mutación 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156 y 170 (la numeración se basa en las secuencias de Pseudomonas fluorescens PF5 KARI). Por ello, el experto en la técnica comprenderá que las mutaciones en estas posiciones, así como las comentadas anteriormente que han sido verificadas experimentalmente darán lugar también a enzimas KARI que tienen la capacidad de unir NADH.

Cepas anfitrionas para ingeniería Kari

Dos cepas anfitrionas de E. coli TOP10, de Invitrogen y E. coli Bw25113 (ΔilvC, un gen desactivado ilvC), se utilizaron para fabricar constructos que sobreexpresan la enzima KARI en esta divulgación. En la cepa Bw25113, todo el gen ilvC del cromosoma de E. Coli fue reemplazado por una casete de Kanamicina utilizando la tecnología de recombinación de homología rojo Lambda descrita por Kirill et al., (Kirill A. Datsenko y Barry L. Wanner, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 97, 6640-6645, 2000).

Homología de modelado de PF5 KARI con substratos ligados

La estructura de PF5-KARI con NADPH ligado, acetolactato e iones magnesio fue construida basada en la estructura cristalina de P. aeruginosa PAO1-KARI (PDB ID 1 NP3, Ahn H.J. et al, J. Mol. Biol., 328, 505-515, 2003), que tiene el 92% de homología de la secuencia aminoácidos con PF5 KARI. La estructura PAO1-KARI es un homododecámero y cada dodecámero consta de seis homo-dímeros con interfaz de dímero extensiva. El sitio activo de

KARI se encuentra en esta interfaz dímero. El conjunto biológico está formado por seis homo-dímeros situados en los bordes de un tetraedro dando como resultado un dodecámero muy simétrico de una simetría de 23 grupos puntuales. Por simplicidad, sólo la unidad dimérica (monómero A y monómero B) fue construida para el modelo de homología de PF5-KARI en este estudio debido a que el sitio activo es en la interfaz del homo-dímero.

- El modelo de dímero PF5-KARI fue construido en base a las coordenadas del monómero A y del monómero B de PAO1-KARI y la secuencia de PF5-KARI utilizando un visualizador PDB DeepView/Swiss (Guex, N. y Peitsch, MC Electrophoresis 18: 2714-2723, 1997). Este modelo fue importado después para programar O (Jones, T.A. et al, Acta Crystallogr. A 47, 110-119, 1991) en un sistema Silicon Graphics para su posterior modificación.
- La estructura de PAO1-KARI no tiene NADPH, substrato o inhibidor o magnesio en el sitio activo. Por lo tanto, la estructura KARI de espinacas (PDB ID 1 yve, Biou V. et al., The EMBO Journal, 16: 3405-3415, 1997), que tiene iones magnesio, NADPH e inhibidor (N-hidroxi-N-isopropiloxamato) en el sitio de unión del acetolactato, se utilizó para modelar estas moléculas en el sitio activo. La KARI de plantas tiene homología de secuencia muy pequeña con PF5-KARI o con PAO1-KARI (identidad de aminoácidos < 20%), sin embargo, las estructuras en la región del sitio activo de estas dos enzimas KARI son muy similares. Para superponer el sitio activo de estas dos estructuras KARI, se utilizaron comandos LSQ\_ext, LSQ\_improve, LSQ\_mol en el programa O para alinear el sitio activo de monómero A de la espinaca KARI con el monómero A del modelo PF5 KARI. Las coordenadas de NADPH, dos iones magnesio e inhibidor unido en el sitio activo de la espinaca KARI se extrajeron e incorporaron a la molécula A de PF5 KARI. Un conjunto de las coordenadas de estas moléculas se generaron para el monómero B de PF5 KARI aplicando el operador de transformación de monómero A a monómero B calculado por el programa.
- 20 Debido a que no hay NADPH en el sitio activo de la estructura cristalina PAO1 KARI, las estructuras de la región del bucle de unión de fosfato en el sitio de unión de NADPH (restos 44-45 en PAO1 KARI, 157-170 en Espinaca KARI) son muy diferentes entre los dos. Para modelar la forma ligada NADPH, el modelo del bucle de unión de fosfato PF5-KARI (44-55) fue sustituido por el de 1yve (157-170). Cualquier discrepancia de las cadenas laterales entre estas dos se transformó en las de la secuencia de PF5-KARI utilizando el comando mutate replace en el programa 25 O, y las conformaciones de las cadenas laterales sustituidas se ajustaron manualmente. El modelo completo PF5-KARI dimérico ligado a NADPH/Mg/inhibidor fue mediante una vuelta de minimización de energía utilizando el programa CNX (ACCELRYS San Diego CA, Burnger, A.T. y Warren, G.L., Acta Crystallogr., D 54, 905-921, 1998) después de lo cual el inhibidor fue sustituido por el substrato, acetolactato (AL), en el modelo. La conformación de AL se ajustó manualmente para favorecer la transferencia de hidruro de C4 de la nicotinamina de NADPH y el substrato. No se realizó ninguna minimización de energía adicional en este modelo (Coordenadas del modelo creado 30 para este estudio se adjuntan en un archivo de Word separado). Los restos en el bucle de unión a fosfato y sus interacciones con NADPH se ilustran en la Figura 3.

Aplicación de un perfil de Modelo Oculto de Markov para la identificación de posiciones de restos involucrados en la conmutación del cofactor en enzimas KARI

- Los solicitantes han desarrollado un procedimiento para la identificación de enzimas KARI y las posiciones de los restos que están involucradas en la conmutación del cofactor NADPH por NADH. Para caracterizar estructuralmente las enzimas KARI, se preparó un perfil de Modelo Oculto de Markov (HMM) como se describe en el Ejemplo 5 utilizando secuencias de aminoácidos de las 25 proteínas KARI con función verificada experimentalmente como se indica en la Tabla 6. Estas KARI eran de Pseudomonas fluorescens Pf-5 (ID de SEC Nº: 17), Sulfolobus solfataricus
- P2 (ID de SEC N°: 13), Pyrobaculum aerophilum str. IM2 (ID de SEC N°: 14), Natronomonas pharaonis DSM 2160 (ID de SEC N°: 30), Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168 (ID de SEC N°: 31), Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 (ID de SEC N°: 32), Phaeospririlum molischianum (ID de SEC N°: 33), Ralstonia solanacearum GMI1000 (ID de SEC N°: 15), Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4 (ID de SEC N°: 34), Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1 (ID de SEC N°: 35), Campylobacter lari RM2100 (ID de SEC N°: 36), Marinobacter aquaeolei VT8 (ID de SEC N°: 37),
- Psychrobacter arcticus 273-4 (ID de SEC N°: 38), Hahella chejuensis KCTC 2396 (ID de SEC N°: 39), Thiobacillus denitrificans ATCC 25259 (ID de SEC N°: 40), Azotobacter vinelandii AvOP (ID de SEC N°: 41), Pseudomonas syringae pv. syringae B728a (ID de SEC N°: 42), Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 (ID de SEC N°: 43), Pseudomonas putida KT2440 (proteína con ID de SEC N°: 44), Pseudomonas entomophila L48 (ID de SEC N°: 45), Pseudomonas mendocina ymp (ID de SEC N°: 46), Pseudomonas aeruginosa PAO1 (ID de SEC N°: 16), Bacillus cereus ATCC 10987 (ID de SEC N°: 48), y Spinacia oleracea (ID de SEC N°: 18).
  - Además utilizando procedimientos descritos en esta solicitud, se pueden mencionar las secuencias de enzimas KARI Clase II tales como E. coli (ID de SEC Nº: 63 Número de Acceso al Banco de Genes P05793), marine gamma Proteobacterium HTCC2207 (ID de SEC Nº: 64 Número de Acceso al Banco de Genes ZP\_01224863.1), Desulfuromonas acetoxidans (ID de SEC Nº: 65 Número de Acceso al Banco de Genes ZP\_01313517.1) y Pisum sativum (pea) (ID de SEC Nº: 66 Número de Acceso al Banco de Genes 082043)

55

60

Este perfil HMM de las KARI se puede utilizar para identificar cualquier proteína relacionada KARI. Se espera que cualquier proteína que coincida con el perfil HMM con un valor de E <10<sup>-3</sup> utilizando programa de hmmsearch en el paquete HMMER se espera que sea una KARI funcional, que puede ser una KARI bien Clase I o bien Clase II. Las secuencias que coinciden con el perfil HMM dado en el presente documento se analizan entonces para la ubicación

de las 12 posiciones en Pseudomonas fluorescens Pf-5 que conmutan el cofactor de NADPH por NADH. Los once nodos, tal como se define en la sección de construcción del perfil HMM, en el perfil HMM que representan las columnas del alineamiento que corresponden a las once posiciones de conmutación del co-factor en Pseudomonas fluorescens Pf-5 KARI se identifican como nodo 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156 y 170. Las líneas correspondientes a estos nodos en el archivo del modelo son identificadas en la Tabla 9. Un experto en la técnica podrá identificar fácilmente estas 12 posiciones en la secuencia de aminoácidos de una proteína KARI a partir del alineamiento de la secuencia con el perfil HMM utilizando el programa de hmmsearch en el paquete HMMER.

Las enzimas KARI identificadas por este procedimiento, incluyen tanto las enzimas KARI de Clase I como de Clase II de fuentes naturales microbianas o de plantas. Cualquier KARI identificada por este procedimiento se puede utilizar para la expresión heteróloga en las células microbianas.

Por ejemplo, cada uno de los fragmentos de ácido nucleico que codifican KARI descrito en el presente documento pueden utilizarse para aislar genes que codifican proteínas homólogas. El aislamiento de genes homólogos utilizando protocolos dependientes de la secuencia es bien conocido en la técnica. Ejemplos de protocolos dependientes de la secuencia incluyen, pero no se limitan a: 1) procedimientos de hibridación de ácido nucleico; 2) procedimientos de amplificación de ADN y de ARN, como se ejemplifica mediante diversos usos de tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos [por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Mullis et al., patente de EE.UU. No. 4.683.202; reacción en cadena de la ligasa (LCR), Tabor, S. et al., Proc. Acad. Sci. EE.UU. 82: 1074 (1985); o amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), Walker, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89: 392 (1992)]; y 3) procedimientos de construcción de bibliotecas y detección por complementariedad.

Aunque la homología de secuencia entre las enzimas KARI de Clase I y Clase II es baja, la estructura tridimensional de ambas clases de enzimas, particularmente alrededor del sitio activo y de los dominios de unión a nucleótido está altamente conservada (Tygai, R., et al., Protein Science, 34: 399-408, 2001). Los restos de aminoácidos clave que conforman el bolsillo de unión al substrato son altamente conservadas entre estas dos clases incluso aunque no puedan alienarse bien en una simple comparación de secuencias. Puede concluirse, por lo tanto, que los restos que afectan a la especificidad del cofactor identificados en la KARI Clase I (p. ej., las posiciones 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156, y 170 de PF5 KARI) pueden hacerse extensibles a las enzimas KARI Clase II.

#### Rutas biosintéticas del isobutanol

5

10

15

30

35

50

55

Los microorganismos que utilizan hidratos de carbono emplean la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la ruta de Entner y Doudoroff y el ciclo de las pentosas fosfato como las rutas metabólicas centrales, rutas metabólicas que proporcionan energía y precursores celulares para el crecimiento y el mantenimiento. Estas rutas tienen en común el intermedio gliceraldehido-3-fosfato y, en última instancia, se forma piruvato directamente o en combinación con la ruta de EMP. Posteriormente, piruvato se transforma en acetil-cofactor A (acetil-CoA) a través de una variedad de medios. Acetil-CoA sirve como un intermedio clave, por ejemplo, en la generación de ácidos grasos, aminoácidos y metabolitos secundarios. Las reacciones combinadas de transformación de azúcar en piruvato producen energía (p. ej., adenosina-5'-trifosfato, ATP) y equivalentes de reducción (por ejemplo, nicotinamida adenina dinucleótido reducida, NADH, y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida, NADH). NADH y NADPH se deben reciclar a sus formas oxidadas (NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup>, respectivamente). En presencia de aceptores de electrones inorgánicos (p. ej., O<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), los equivalentes de reducción se pueden usar para aumentar el conjunto de energía; como alternativa, se puede formar un subproducto de carbono reducido.

Hay cuatro rutas potenciales para la producción de isobutanol a partir de fuentes de hidratos de carbono con microorganismos recombinantes como se muestra en la Figura 1. Todas las rutas potenciales para la transformación de hidratos de carbono en isobutanol se han descrito en la solicitud de patente de EE.UU. de propiedad común nº 11/586315.

La ruta preferida para la transformación de piruvato a isobutanol consta de etapas enzimáticos "a", "b", "c", "d" y "e" (Figura 1) e incluye las siguientes transformaciones de substrato a producto:

- a) de piruvato a acetolactato, catalizada, por ejemplo, por acetolactato sintasa,
- b) de (S)-acetolactato a 2,3-dihidroxiisovalerato, catalizada, por ejemplo, por acetohidroxiácido isomeroreductasa,
- c) de 2,3-dihidroxiisovalerato a α-cetoisovalerato, catalizada, por ejemplo, por acetohidroxiácido deshidratasa,
- d) de  $\alpha$ -cetoisovalerato a isobutiraldehido, catalizada, por ejemplo, mediante un cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, y
  - e) isobutiraldehido a isobutanol, catalizada, por ejemplo, un alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada.

Esta ruta combina enzimas implicadas en rutas bien caracterizadas para biosíntesis de valina (piruvato a  $\alpha$ -cetoisovalerato) y el catabolismo de valina ( $\alpha$ -cetoisovalerato a isobutanol). Dado que muchas enzimas de biosíntesis de valina también catalizan reacciones análogas en la ruta de la biosíntesis de isoleucina, la especificidad del substrato es una consideración importante en la selección de las fuentes de genes. Por esta razón, los genes

primarios de interés para la enzima acetolactato sintasa son los de Bacillus (alsS) y Klebsiella (budB). Estos acetolactato sintasas particulares son conocidas por participar en la fermentación butanodiol en estos organismos y muestran una mayor afinidad por piruvato en lugar de cetobutirato (Gollop y otros, J. Bacteriol 172, 3444-3449, 1990); y (Holtzclaw et al., J. Bacteriol. 121, 917-922, 1975). Las etapas de las rutas segunda y tercera son catalizadas por acetohidroxiácido reductoisomerasa y deshidratasa, respectivamente. Estas enzimas se han caracterizado a partir de una serie de fuentes, tales como por ejemplo, E. coli (Chunduru et al, Biochemistry 28, 486-493, 1989); y (Flint et al., J. Biol. Chem. 268, 14732-14742, 1993). Las dos etapas finales de la ruta preferida de isobutanol se sabe que ocurren en levadura, que puede utilizar valina como fuente de nitrógeno y, en el proceso, secretar isobutanol. El α-cetoisovalerato se puede transformar en isobutiraldehido mediante una serie de enzimas cetoácido descarboxilasa, tal como, por ejemplo, piruvato descarboxilasa. Para evitar la desviación de piruvato alejada de la producción de isobutanol, se desea una descarboxilasa con afinidad por piruvato disminuida. Hasta el momento, hay dos de tales enzimas conocidas en la técnica (Smit et al, Appl. Environ. Microbiol., 71, 303-311, 2005); y (de la Plaza et al., FEMS Microbiol. Lett., 238, 367-374, 2004). Ambas enzimas son de cepas de Lactococcus lactis y tienen una preferencia de 50-200 veces por cetoisovalerato en lugar de por piruvato. Por último, en la levadura se han identificado una serie de aldehido reductasas, muchas de ellas con especificidad de substrato superpuesta. Las conocidas por preferir substratos de cadena ramificada frente a acetaldehido incluyen, pero no se limitan a alcohol deshidrogenasa VI (ADH6) e Ypr1p (Larroy et al, Biochem J. 361, 163-172, 2002); y (Ford et al., Yeast 19, 1087-1096, 2002), ambos de los cuales utilizan NADPH como donante de electrones. Una reductasa dependiente de NADPH, YqhD, activa con substratos de cadena ramificada también se ha identificado recientemente en E. coli (Sulzenbacher et al., J. Mol. Biol. 342, 489-502, 2004).

Dos de las otras rutas potenciales para la producción de isobutanol también contienen las tres etapas iniciales de "a", "b" y "c" (Figura 1). Una ruta consiste en etapas enzimáticas "a", "b", "c", "f", "g", "e" (Figura 1). La etapa "f" que contiene un "cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada", con un número EC 1.2.4.4. La etapa "g" que contiene un "aldehido deshidrogenasa acilante" con unos números EC 1.2.1.10 y 1.2.1.57, además de una etapa "e" que contiene el "alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada". La otra ruta potencial consiste en las etapas "a", "b", "c", "h", "i", "j", "e" (Figura 1). El término "transaminasa" (etapa "h") números EC 2.6.1.42 y 2.6.1.66. La etapa "h" consiste en bien una "valina deshidrogenasa" con números EC 1.4.1.8 y 1.4.1.9 o bien la etapa "i", una "valina descarboxilasa" con un número EC 4.1.1.14. Por último, la etapa "j" utilizará una " omega transaminasa " con un número EC 2.6.1.18 para generar isobutiraldehido que se reducirá por la etapa "e" para producir isobutanol. Todas las rutas potenciales para la transformación de piruvato en isobutanol se representan en la Figura 1.

Además, una serie de organismos se sabe que producen butirato y/o butanol a través de un intermedio de butiril-CoA (Dürre, et al, FEMS Microbiol Rev. 17, 251-262, 1995); y (Abbad-Andaloussi et al., Microbiology 142, 1149-1158, 1996). Por lo tanto la producción de isobutanol en estos organismos se llevará a cabo utilizando las etapas "k", "g" y "e" mostradas en la Figura 1. La etapa "k" utilizará un "mutasa isobutiril CoA" con un número EC 5.4.99.13. La siguiente etapa implicará utilizar el " aldehido deshidrogenasa acilante " con los números EC 1.2.1.10 y 1.2.1.57 para producir isobutiraldehido seguido por la etapa "e" enzimática para producir isobutanol. Todas estas rutas se describen completamente en la solicitud de patente de propiedad común CL3243.

Por ello, en la provisión de múltiples rutas recombinantes de piruvato a isobutanol, existe una serie de opciones para cumplir con las etapas de transformación individuales, y la persona experta en la técnica podrá utilizar las secuencias disponibles al público para construir las rutas relevantes.

#### Anfitriones Microbianos para Producción de Isobutanol

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Los anfitriones microbianos para la producción de isobutanol se pueden seleccionar de bacterias, cianobacterias, hongos filamentosos y levaduras. El anfitrión microbiano utilizado para la producción de isobutanol debe ser tolerante a isobutanol manera que el rendimiento no esté limitado por la toxicidad del butanol. Los microbios que son metabólicamente activos a elevados niveles de titulación de isobutanol no son bien conocidos en la técnica. Aunque se han aislado mutantes tolerantes al butanol a partir de solventogénesis de Clostridia, poca información hay disponible sobre la tolerancia a butanol de otras cepas bacterianas potencialmente útiles. La mayoría de los estudios sobre la comparación de la tolerancia al alcohol en bacterias sugieren que butanol es más tóxico que etanol (de Cavalho, et al., Microsc. Res. Tech. 64, 215-222, 2004) y (Kabelitz, et al., FEMS Microbiol. Lett. 220, 223-227, 2003, Tomas, et al. J. Bacteriol. 186, 2006-2018, 2004) informan que el rendimiento de 1-butanol durante la fermentación en Clostridium acetobutylicum puede estar limitada por la toxicidad de 1-butanol. El efecto primario de 1-butanol en Clostridium acetobutylicum es la interrupción de las funciones de la membrana (Hermann et al., Appl. Environ. Microbiol., 50, 1238-1243, 1985).

Los anfitriones microbianos seleccionados para la producción de isobutanol deben ser tolerantes a isobutanol y deberían ser capaces de transformar los hidratos de carbono en isobutanol. Los criterios para la selección de anfitrionas microbianas adecuadas incluyen los siguientes: tolerancia intrínseca a isobutanol, alta tasa de utilización de la glucosa, disponibilidad de las herramientas genéticas para la manipulación de genes y capacidad para generar alteraciones cromosómicas estables.

Cepas anfitrionas adecuadas con tolerancia a isobutanol se pueden identificar mediante el cribado basado en la tolerancia intrínseca de la cepa. La tolerancia intrínseca de los microbios a isobutanol se puede medir determinando

la concentración de isobutanol que es responsable de la inhibición del 50% de la tasa de crecimiento ( $IC_{50}$ ) cuando se cultiva en un medio mínimo. Los valores de  $IC_{50}$  se pueden determinar utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los microbios de interés pueden ser cultivados en presencia de diversas cantidades de isobutanol y la tasa de crecimiento controlada midiendo la densidad óptica a 600 nanometros. El tiempo de duplicación puede calcularse a partir de la parte logarítmica de la curva de crecimiento y utilizarse como una medida de la tasa de crecimiento. La concentración de isobutanol que produce una inhibición del 50% del crecimiento se puede determinar a partir de un gráfico de la inhibición porcentual del crecimiento frente a la concentración de isobutanol. Preferiblemente, la cepa anfitriona debe tener una  $IC_{50}$  para isobutanol de más de aproximadamente 0,5%.

La anfitriona microbiana en la producción de isobutanol también debería utilizar la glucosa a una tasa elevada. La mayoría de los microbios son capaces de utilizar hidratos de carbono. Sin embargo, ciertos microbios del ambiente no pueden utilizar los hidratos de carbono con alta eficiencia y, por lo tanto, no serían anfitriones adecuados.

La capacidad de modificar genéticamente la anfitriona es esencial para la producción de cualquier microorganismo recombinante. El modo de la tecnología de transferencia de genes puede ser por electroporación, conjugación, transducción o transformación natural. Se dispone de una amplia gama de plásmidos conjugados anfitriones y marcadores de resistencia a los medicamentos. Los vectores de clonación se adaptan a las organismos anfitriones basado en la naturaleza de los marcadores con resistencia a los antibióticos que pueden funcionar en ese anfitrión.

El anfitrión microbiano también tiene que ser manipulado con el fin de desactivar las rutas que compiten en el flujo de carbono eliminando varios genes. Esto requiere la disponibilidad tanto de transposones para desactivación directa como vectores de integración cromosómica. Además, la anfitriona de producción debe ser susceptible de mutagénesis química por lo que se puede obtener mutaciones que mejoren la tolerancia intrínseca de isobutanol.

Basado en los criterios descritos anteriormente, anfitriones microbianos adecuados para la producción de isobutanol incluyen, pero no se limitan a miembros de los géneros Clostridium, Zymomonas, Escherichia, Salmonella, Rhodococcus, Pseudomonas, Bacillus, Vibrio, Lactobacillus, Enterococcus, Alcaligenes, Klebsiella, Paenibacillus, Arthrobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, Pichia, Candida, Hansenula y Saccharomyces. Anfitriones preferidos incluyen: Escherichia coli, Alcaligenes eutrophus, Bacillus licheniformis, Paenibacillus macerans, Rhodococcus erythropolis, Pseudomonas putida, Lactobacillus plantarum, Enterococcus faecium, Enterococcus gallinarium, Enterococcus faecalis, Bacillus subtilis y Saccharomyces cerevisiae.

Construcción de un anfitrión de producción

5

15

20

25

40

Organismos recombinantes que contienen los genes necesarios que codificarán la ruta enzimática para la transformación de un substrato de carbono fermentable a isobutanol puede construirse utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. En la presente invención, los genes que codifican las enzimas de una de las rutas de biosíntesis de isobutanol de la invención, por ejemplo, acetolactato sintasa, acetohidroxiácido isomeroreductasa, acetohidroxiácido deshidratasa, α-cetoácido descarboxilasa de cadena ramificada, y alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada, se pueden aislar de varias fuentes, como se describió anteriormente.

Los procedimientos de obtención de los genes deseados a partir de un genoma bacteriano son frecuentes y bien conocidos en la técnica de la biología molecular. Por ejemplo, si se conoce la secuencia del gen, pueden crearse genotecas adecuadas por digestión con endonucleasas de restricción y se pueden cribar con sondas complementarias a la secuencia del gen deseado. Una vez que se aísla la secuencia, el ADN puede ser amplificado utilizando procedimientos estándares de amplificación dirigida al cebador tal como la reacción en cadena de la polimerasa (patente de EE.UU. nº 4.683.202) para obtener cantidades de ADN adecuado para la transformación utilizando vectores apropiados. Las herramientas para la optimización de codones para la expresión en un anfitrión heterólogo están fácilmente disponibles. Algunas herramientas para la optimización de codones están disponibles basadas en el contenido de GC del organismo anfitrión.

Una vez que se identifican los genes de la ruta relevante y se aíslan pueden ser transformados en adecuados anfitriones de expresión por medios bien conocidos en la técnica. Los vectores o casetes útiles para la transformación de una variedad de células anfitrionas son comunes y disponibles comercialmente de compañías tales como EPICENTRE® (Madison, WI), Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA), Stratagene (La Jolla, CA), y New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA). Típicamente, el vector o casete contiene secuencias que dirigen la transcripción y traducción del gen relevante, un marcador seleccionable, y secuencias que permiten la replicación autónoma o la integración cromosómica. Los vectores adecuados comprenden una región 5' del gen que alberga controles de iniciación de la transcripción y una región 3' del fragmento de ADN que controla la terminación de la transcripción. Ambas regiones de control se pueden derivar de genes homólogos a la célula anfitriona transformada, aunque se debe entender que tales regiones de control también se pueden derivar de genes que no son nativos para la especie específica escogida como anfitriona de producción.

Regiones o promotores de control de la iniciación, que son útiles para dirigir la expresión de las regiones codificantes de la ruta relevante en la célula anfitriona deseada son numerosas y familiares para los expertos en la técnica. Prácticamente cualquier promotor capaz de conducir estos elementos genéticos es adecuado para la presente

invención incluyendo, pero sin limitarse a CYC1, HIS3, GAL1, GAL10, ADH1, PGK, PH05, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO, TPI (útiles para la expresión en Saccharomyces); AOX1 (útil para la expresión en Pichia); y lac, ara, tet, trp, IP<sub>L</sub>, IP<sub>R</sub>, T7, tac y trc (útiles para la expresión en Escherichia coli, Alcaligenes y Pseudomonas), así como los promotores amy, abr y npr, y diversos promotores de fagos útiles para la expresión en Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis y Paenibacillus macerans.

Regiones de control de terminación también se pueden derivar de diversos genes nativos para los anfitriones preferidos. Opcionalmente, un sitio de terminación puede ser innecesario, sin embargo, es más preferido si está incluido.

Ciertos vectores son capaces de replicarse en una amplia gama de bacterias anfitrionas y se pueden transferir por conjugación. Están disponibles la secuencia completa y anotada de pRK404 y las de tres vectores relacionados, pRK437, pRK442 y pRK442(H). Estos derivados han demostrado ser valiosas herramientas para la manipulación genética en bacterias Gram-negativas (Scott et al., Plasmid 50, 74-79, 2003). Varios derivados del plásmido de la amplia gama de anfitriones Inc P4 plasmid RSF1010 también están disponibles con promotores que pueden funcionar en una gama de bacterias Gram-negativas. Los plásmidos pAYC36 y pAYC37 tienen promotores activos junto con sitios de clonación múltiple para permitir la expresión de genes heterólogos en bacterias Gram-negativas.

También están ampliamente disponibles herramientas para la sustitución cromosómica de los genes. Por ejemplo, una variante termosensible del replicón pWV101 de una amplia gama de anfitrionas se ha modificado para construir un plásmido pVE6002 que se puede utilizar para efectuar la sustitución de genes en una gama de bacterias Grampositivas (Maguin et al., J. Bacteriol. 174, 5633-5638, 1992). Además, se dispone de transposomas in vitro para crear mutaciones aleatorias en una variedad de genomas de fuentes comerciales tales como EPICENTRE®.

La expresión de una ruta de biosíntesis de isobutanol en varios anfitrionas microbianas preferidas se describe con más detalle a continuación.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en E. coli

20

30

35

50

Los vectores o casetes útiles para la transformación de E. coli son comunes y disponibles comercialmente de las empresas enumeradas anteriormente. Por ejemplo, los genes de una ruta biosintética de isobutanol se pueden aislar de diversas fuentes, clonado en un vector pUC19 modificado y transformado en E. coli NM522.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en Rhodococcus erythropolis

Una serie de vectores lanzadera E. coli-Rhodococcus están disponibles para la expresión en R. erythropolis, que incluyen, pero no se limitan a pRhBR17 y pDA71 (Kostichka et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 62, 61-68, 2003). Además, una serie de promotores están disponibles para la expresión génica heteróloga en R. erythropolis (Nakashima et al., Appl. Environ. Microbiol. 70, 5557-5568, 2004 y Tao et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 68, 346-354, 2005). La disrupción de genes diana de los genes cromosómicos en R. erythropolis puede ser creada utilizando el procedimiento descrito por Tao et al., supra, y Brans et al. (Appl. Environ. Microbiol. 66, 2029-2036, 2000).

Los genes heterólogos requeridos para la producción de isobutanol, como se describió anteriormente, pueden ser clonado inicialmente en pDA71 o pRhBR71 y transformados en E. coli. Los vectores pueden después ser transformados en R. erythropolis mediante electroporación, como se describe por Kostichka et al., supra. Los recombinantes pueden cultivarse en un medio sintético que contiene glucosa y la producción de isobutanol se puede seguir utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en B. subtilis

Los procedimientos para la expresión génica y la creación de mutaciones en B. subtilis son también bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los genes de una ruta biosintética de isobutanol se pueden aislar de diversas fuentes, clonados en un vector pUC19 modificado y transformados en Bacillus subtilis BE1010. Además, los cinco genes de una ruta biosintética de isobutanol se pueden dividir en dos operones para la expresión. Los tres genes de la ruta (bubB, ilvD y kivD) pueden integrarse en el cromosoma de Bacillus subtilis BE1010 (Payne, et al., J. Bacteriol. 173,
 2278-2282, 1991). Los dos genes restantes (ilvC y bdhB) pueden clonarse en un vector de expresión y transformarse en la cepa de Bacillus que lleva los genes de isobutanol integrados.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en B. licheniformis

La mayoría de los plásmidos y vectores lanzadera que se replican en B. subtilis pueden utilizarse para transformar B. licheniformis por cualquier transformación o electroporación de protoplastos. Los genes requeridos para la producción de isobutanol se pueden clonar en plásmidos pBE20 o derivados de pBE60 (Nagarajan et al., Gene 114, 121-126, 1992). Los procedimientos para transformar B. licheniformis son conocidos en la técnica (Fleming et al. Appl. Environ. Microbiol., 61, 3775-3780, 1995). Los plásmidos construidos para expresión en B. subtilis pueden ser transformados en B. licheniformis para producir una anfitriona microbiana recombinante que produce isobutanol.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en Paenibacillus macerans

Los plásmidos pueden construirse como se describió anteriormente para expresión en B. subtilis y se utilizaron para transformar Paenibacillus macerans por transformación de protoplastos para producir una anfitriona microbiana recombinante que produce isobutanol.

Expresión de la ruta biosintética de isobutanol en Alcaligenes (Ralstonia) eutrophus

Los procedimientos para la expresión génica y la creación de mutaciones en Alcaligenes eutrophus son conocidos en la técnica (Taghavi et al., Appl. Environ. Microbiol., 60, 3585-3591, 1994). Los genes para una ruta biosintética de isobutanol se pueden clonar en cualquiera de los vectores de amplia gama de anfitriones descritos anteriormente, y electroporados para generar recombinantes que producen isobutanol. La ruta de poli(hidroxibutirato) en Alcaligenes se ha descrito en detalle, una variedad de técnicas genéticas para modificar el genoma de Alcaligenes eutrophus es conocido, y esas herramientas se pueden aplicar para la ingeniería de una ruta biosintética de isobutanol.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en Pseudomonas putida

Los procedimientos para la expresión génica en Pseudomonas putida son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ben-Bassat et al., patente de EE.UU. No. 6.586.229, que se incorpora en el presente documento como referencia). Los genes de la ruta del butanol se pueden insertar en pPCU18 y este ADN ligado se puede someter a electroporación en células electrocompetentes Pseudomonas putida DOT-T1 C5aAR1 para generar recombinantes que producen isobutanol.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en Saccharomyces cerevisiae

Los procedimientos para la expresión génica en Saccharomyces cerevisiae son conocidos en la técnica (p. ej., Methods in Enzymology, volumen 194, Guide to Yeast Genetics and Molecular and cell Biology, Part A, 2004, Christine Guthrie y Gerald R. Fink, eds., Elsevier Académico Press, San Diego, CA). La expresión de genes en la levadura requiere típicamente un promotor, seguido por el gen de interés, y un terminador de la transcripción. Se puede utilizar una serie de promotores de levadura en la construcción de casetes de expresión para los genes que codifican una ruta biosintética de isobutanol, que incluyen, pero no se limita a promotores constitutivos FBA, GPD, ADH1 y GPM, y los promotores inducibles GAL1, GAL10, CUP1. Terminadores de la transcripción adecuados incluyen, pero no se limitan a FBAT, GPDt, GPMT, ERG10t, GAL1t, CYC1 y ADH1. Por ejemplo, promotores adecuados, terminadores de la transcripción, y los genes de una ruta biosintética de isobutanol se pueden clonar en vectores lanzadera de E. coli-levadura.

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol de Lactobacillus plantarum

El género Lactobacillus pertenece a la familia Lactobacillales y muchos plásmidos y vectores utilizados en la transformación de Bacillus subtilis y Streptococcus pueden ser usados para lactobacillus. Ejemplos no limitantes de vectores adecuados incluyen pAMβ1 y sus derivados (Renault et al, Gene 183, 175-182, 1996); y (O'Sullivan et al, Gene 137, 227-231, 1993.); pMBB1 y pHW800, un derivado de pMBB1 (Wyckoff et al, Appl Environ Microbiol 62, 1481-1486, 1996); pMG1, un plásmido conjugativo (Tanimoto et al, J. Bacteriol 184, 5800-5804, 2002); pNZ9520 (Kleerebezem et al, Appl Environ Microbiol 63, 4581-4584, 1997); pAM401 (Fujimoto et al, Appl Environ Microbiol 67, 1262-1267, 2001); y pAT392 (Arthur et al., Antimicrob. Agents Chemother. 38, 1899-1903, 1994). Varios plásmidos de Lactobacillus plantarum también han sido informados (van Kranenburg R, et al. Appl. Environ. Microbiol. 71, 1223-1230, 2005).

Expresión de una ruta biosintética de isobutanol en varias especies de Enterococcus (E. faecium, E. gallinarium y E. faecalis)

El género Enterococcus pertenece a la familia Lactobacillales y muchos plásmidos y vectores utilizados en la transformación de las especies Lactobacilli, Bacilli y Streptococci pueden ser utilizados para la especie Enterococcus. Los ejemplos no limitantes de vectores adecuados incluyen pAMβ1 y sus derivados (Renault et al., Gene 183, 175-182, 1996.); y (O'Sullivan et al, Gene 137, 227-231, 1993); pMBB1 y pHW800, un derivado de pMBB1 (Wyckoff et al Appl Environ Microbiol 62, 1481-1486, 1996); pMG1, un plásmido conjugativo (Tanimoto et al, J. Bacteriol 184, 5800-5804, 2002..); pNZ9520 (Kleerebezem et al., Appl Environ Microbiol 63, 4581-4584, 1997); pAM401 (Fujimoto et al, Appl Environ Microbiol 67, 1262-1267, 2001); y pAT392 (Arthur et al., Antimicrob. Agents Chemother. 38, 1899-1903, 1994). También pueden utilizarse los vectores de expresión para E. faecalis que utilizan el gen nisA de Lactococcus (Eichenbaum et al., Appl. Environ. Microbiol., 64, 2763-2769, 1998). Además, pueden utilizarse vectores para la sustitución de genes en el cromosoma E. faecium (Nallaapareddy et al., Appl. Environ. Microbiol., 72, 334-345, 2006).

#### Medios de Fermentación

15

20

25

55

Los medios de fermentación en la presente invención deben contener substratos de carbono adecuados. Los substratos adecuados pueden incluir, pero no se limitan a monosacáridos tales como glucosa y fructosa, oligosacáridos tales como lactosa o sacarosa, polisacáridos tales como almidón o celulosa o mezclas de los mismos y mezclas no purificadas a partir de materias primas renovables tales como permeato de suero de queso, licor de maíz fermentado, melazas de remolacha azucarera y malta de cebada. Además, el substrato de carbono puede ser

también substratos tal como dióxido de carbono, o metanol para el que se ha demostrado la transformación metabólica en intermedios bioquímicos claves. Además de substratos de carbono uno y dos los organismos metilotróficos son también conocidos por utilizar una serie de otros compuestos que contienen carbono tales como metilamina, glucosamina y una variedad de aminoácidos para actividad metabólica. Por ejemplo, se conoce la levadura metilotrófica por utilizar el carbono de la metilamina para formar trehalosa o glicerol (Bellion et al., Microb. Growth C1 Compd., [Int. Symp.], 7º (1993), 415-432. (eds): Murrell, J. Collin; Kelly, Don P. Publisher: intercept, Andover, Reino Unido). Del mismo modo, diversas especies de Candida metabolizarán la alanina o el ácido oleico (Sulter et al., Arch. Microbiol., 153, 485-489, 1990). Por lo tanto, se contempla que la fuente de carbono utilizada en la presente invención puede abarcar una amplia variedad de substratos que contienen carbono y solamente estará limitado por la elección del organismo.

Aunque se contempla que todos los substratos de carbono mencionados anteriormente y mezclas de los mismos son adecuados en la presente invención, los preferidos son los substratos de carbono glucosa, fructosa y sacarosa.

Además de una apropiada fuente de carbono, los medios de fermentación deben contener adecuados minerales, sales, cofactores, tampones y otros componentes, conocidos por los expertos en la técnica, adecuados para el crecimiento de los cultivos y la promoción de la ruta enzimática necesaria para la producción de isobutanol.

#### Condiciones de cultivo

5

10

15

20

45

50

55

Normalmente las células se cultivan a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25°C a 40°C, en un medio apropiado. Medios de crecimiento adecuados en la presente invención son medios comunes preparados comercialmente, tales como el caldo de cultivo Luria Bertani (LB), Sabouraud Dextrosa (SD) o el caldo de cultivo Yeast medium (YM). Otros medios de cultivo definidos o sintéticos también pueden utilizarse y el medio apropiado para el cultivo del microorganismo particular será conocido por el experto en la técnica de la microbiología o de la ciencia de la fermentación. El uso de agentes conocidos para modular la represión del catabolito directa o indirectamente, p. ej., adenosin-2',3'-monofosfato cíclica (cAMP), también se pueden incorporar en el medio de fermentación.

Los intervalos de pH adecuados para la fermentación están entre pH 5,0 y pH 9,0, donde se prefiere pH 6,0 a pH 8,0 para el estado inicial.

Las fermentaciones se pueden realizar en condiciones aerobias o anaerobias, donde se prefieren las condiciones anaerobias o microaerobias.

Fermentaciones industriales por lote y en continuo

30 El presente proceso emplea un procedimiento de fermentación por lotes. Una fermentación por lotes clásica es un sistema cerrado donde la composición del medio se fija al comienzo de la fermentación y no está sujeta a alteraciones artificiales durante la fermentación. Por ello, al comienzo de la fermentación el medio se inocula con el organismo u organismos deseados, y se permite que la fermentación tenga lugar sin añadir nada al sistema. Típicamente, sin embargo, una fermentación "por lotes" es por lotes con respecto a la adición de fuente de carbono y a menudo se hacen intentos de controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno. En los sistemas por lotes las composiciones de metabolito y biomasa del sistema cambian constantemente hasta el momento en que se detiene la fermentación. Dentro de los cultivos por lotes, las células se moderan a través de una fase de latencia estática hasta una fase log de gran desarrollo y finalmente a una fase estacionaria donde la velocidad de crecimiento disminuye o se detiene. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria finalmente morirán. Las células en la fase log son responsables en general de la mayor parte de la producción del producto final o del intermedio.

Una variación en el sistema por lotes estándar es el sistema de lote alimentado. Los procesos de fermentación de lote alimentado son también adecuados en la presente invención y comprenden un típico sistema por lotes con la excepción de que el substrato se añade en incrementos a medida que progresa la fermentación. Los sistemas de lote alimentado son útiles cuando la represión de catabolito es apta para inhibir el metabolismo de las células y donde es deseable tener cantidades limitadas de substrato en los medios. La medición de la concentración de substrato real en los sistemas de lote alimentado por lotes es difícil y por lo tanto se estima sobre la base de los cambios de factores medibles tales como el pH, el oxígeno disuelto y la presión parcial de gases residuales tales como CO<sub>2</sub>. Las fermentaciones por lotes y por lote alimentado son comunes y bien conocidas en la técnica y los ejemplos se pueden encontrar en Thomas D. Brock en Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Segunda Edición (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, o Deshpande, Mukund (Appl. Biochem. Biotechnol., 36, 227, 1992).

Aunque la presente invención se realiza en modo por lotes se contempla que el procedimiento sería adaptable a procedimientos de fermentación continua. La fermentación continua es un sistema abierto donde se añade un medio de fermentación definido continuamente a un biorreactor y una cantidad igual de medio acondicionado se elimina simultáneamente durante el procesamiento. La fermentación continua mantiene generalmente los cultivos a una alta densidad constante donde las células están principalmente en crecimiento en fase log.

La fermentación continua permite la modulación de un factor o de cualquier número de factores que afectan el

crecimiento celular o la concentración de producto final. Por ejemplo, un procedimiento mantendrá un nutriente limitante tal como la fuente de carbono o el nivel de nitrógeno a una tasa fija y permite que los otros parámetros se moderen. En otros sistemas, una serie de factores que afectan al crecimiento puede ser continuamente alterado mientras la concentración celular, medida por la turbidez media, se mantiene constante. Los sistemas continuos se esfuerzan por mantener condiciones de crecimiento en estado estacionario y así la pérdida celular debida al medio que es retirado debe equilibrarse frente al crecimiento celular en la fermentación. Los procedimientos de modulación de nutrientes y factores de crecimiento para los procesos de fermentación continua así como las técnicas para maximizar la tasa de formación de producto son bien conocidos en la técnica de la microbiología industrial y una variedad de procedimientos son detallados por Brock, supra.

10 Se contempla que la presente invención puede ponerse en práctica utilizando procesos bien por lotes, por lotes alimentados o en continuo, y que cualquier modo conocido de fermentación sería adecuado. Adicionalmente, se contempla que las células pueden inmovilizarse en un substrato como catalizadores de células enteras y someterse a condiciones de fermentación para la producción de isobutanol.

Procedimientos para el aislamiento del isobutanol del medio de fermentación

El isobutanol producido biológicamente puede ser aislado del medio de fermentación utilizando procedimientos conocidos en la técnica para fermentaciones acetona-butanol-etanol (ABE) (véase, por ejemplo, Durre, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49, 639-648, 1998), y (Groot et al., Proceso. Biochem. 27, 61-75, 1992 y referencias en el mismo). Por ejemplo, los sólidos pueden ser eliminados del medio de fermentación por centrifugación, filtración, decantación y el isobutanol puede ser aislado del medio de fermentación utilizando procedimientos tales como destilación, destilación azeotrópica, extracción líquido-líquido, adsorción, extracción de gas, evaporación por membrana o pervaporación.

#### **Ejemplos**

30

35

5

La presente invención se define adicionalmente en los siguientes Ejemplos. Debe entenderse que estos Ejemplos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan solo a modo de ilustración.

25 Procedimientos generales:

Las técnicas de ADN recombinante y de clonación molecular estándares utilizadas en los Ejemplos son bien conocidas en la técnica y se describen por Sambrook, J., Fritsch, EF y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, por T.J. Silhavy, M.L. Bennan y L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1984, y por Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience, NY, 1987. Materiales y procedimientos adecuados para el mantenimiento y crecimiento de cultivos bacterianos son bien conocidos en la técnica. Las técnicas adecuadas para utilizar en los siguientes ejemplos se pueden encontrar en el Manual of Methods for General Bacteriology, Phillipp Gerhardt, RGE Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg y G. Briggs Phillips, eds., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1994, o por Thomas D. Brock en Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Segunda Edición, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 1989. Todos los reactivos, las enzimas de restricción y los materiales utilizados para el crecimiento y mantenimiento de las células bacterianas se obtuvieron de Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI), BD Diagnostic Systems (Sparks, MD.), Life Technologies (Rockville, MD.), o Sigma Chemical Company (San Luis, MO), a menos que se especifique lo contrario.

El significado de las abreviaturas utilizadas es el siguiente: "Å" significa Angstrom, "min" significa minuto (o minutos), "h" significa hora (u horas), "μl" significa microlitro (o microlitros), "ng/μl" significa nanogramos por microlitro, "pmol/μl" significa picomol por microlitro, "ml" significa millilitro (o millilitros), "l" significa litro (o litros), "g/l" significa gramo por litro, "ng" significa nanogramo, "s" significa segundo (o segundos), "ml/min" significa millilitro por minuto (o por minutos), "w/v" significa peso por volumen, "v/v" significa volumen por volumen, "nm" significa nanometro (o nanometros), "mm" significa millimetro (o millimetros), "cm" significa centímetro (o centímetros) "mM" se refiere a millimolar, "M" significa molar, "mmol" se refiere a millimol (o millimoles), "μποl" significa micromol (o micromoles), "g" significa gramo (o gramos), "μg" se refiere a microgramo (o microgramos), "mg" significa milligramo (o miligramos), "g" se refiere a la constante de la gravitación, "rpm" significa revoluciones por minuto, "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento "MS" se refiere a espectrometría de masas, "HPLC/MS" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento/espectrometría de masas", AEDT" significa ácido etilendiaminotetraacético, "dNTP" significa desoxinucleótido trifosfato.

Los cebadores de oligonucleótidos utilizados en los siguientes Ejemplos se han descrito en el presente documento (véase la Tabla 1)

Ensayo de cribado de alto rendimiento de genotecas

El cribado de alto rendimiento de las genotecas de enzimas KARI mutantes se realizó como se describe en el presente documento: 10 × medio de congelación que contiene 554,4 g/l de glicerol, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 68 mM, MgSO<sub>4</sub> 4 mM, citrato de sodio 17 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 132 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 36 mM se preparó con agua pura molecular y esterilizada

por filtración. Se preparó medio de congelación diluyendo el medio de congelación 10 veces con el medio LB. Una alícuota (200 µl) del medio de congelación se utilizó para cada pocillo de las placas de archivo de 96 pocillos (nº de Catálogo 3370, Corning Inc. Corning, NY).

Se seleccionaron clones de las placas de agar LB y se inocularon en las placas de archivo de 96 pocillos que contenían el medio de congelación y se cultivaron durante la noche a 37°C sin agitación. Las placas de archivo a continuación, se almacenaron a -80°C. La cepa E coli Bw25113 transformada con pBAD-HisB (Invitrogen) se utilizó siempre como control negativo. Para las bibliotecas C, E, F y G, se utilizó T52D mutante de (PF5-ilvC) como control positivo. El T52D mutante era un mutante de PF5-ilvC en el que la treonina en la posición 52 se cambió por ácido aspártico. Para biblioteca H, C3B11 mutante (R47F/S50A/T52D/v53W de PF5-ilvC) se utilizó como control positivo.

Los clones de placas de archivos se inocularon en los pocillos de 96 de profundidad. Cada pocillo contenía 3.0 µl de células a partir de placas de archivos descongeladas, 300 µl de medio LB que contenía 100 mg/ml de ampicilina y 0,02% (peso/vol.) de arabinosa como inductor. Las células se cultivaron durante la noche a 37°C con 80% de humedad con agitación (900 rpm), se recogieron por centrifugación (4.000 rpm, 5 min a 25°C). (centrífuga Eppendorf, Brinkmann Instruments, Inc. Westbury, NY) y el sedimento celular se almacenó a -20°C para su posterior análisis.

El substrato de ensayo, (R,S)-acetolactato, se sintetizó como se describió por Aulabaugh y Schloss (Aulabaugh y Schloss, Biochemistry, 29, 2824-2830, 1990): 1,0 g de éster etílico del ácido 2-acetoxi-2-metil-3-oxobutírico (Aldrich, Milwaukee, WI) se mezcló con 10 ml de NaOH (1,0 M) y se agitó a temperatura ambiente. Cuando el pH de la solución se hizo neutro, NaOH adicional se añadió lentamente hasta que se mantuvo pH~8,0. Todos los otros productos químicos utilizados en el ensayo fueron adquiridos de Sigma.

La transformación enzimática de acetolactato a  $\alpha$ , $\beta$ -dihidroxi-isovalerato por KARI fue seguido por la medición de la desaparición del cofactor, NADPH o NADH, a partir de la reacción a 340 nm utilizando un lector de placas (Molecular Device, Sunnyvale, CA). La actividad se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar de 6220  $M^{-1}$ cm $^{-1}$ , ya sea para NADPH o NADH. Las soluciones madre utilizadas fueron:  $K_2HPO_4$  (0,2 M);  $KH_2PO_4$  (0,2 M) de la mezcla madre del tampón de reacción que contenía: 4,8 ml  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$  0,2 ml, 4,0 ml de  $KI_2PO_4$  0,1 ml de  $KI_2PO_4$  0,9 ml de agua.

El sedimento celular congelado en placas de pocillos hondos y BugBuster se calentaron a temperatura ambiente durante 30 min, al mismo tiempo. Cada pocillo de las placas de ensayo de 96 pocillos se llenó con 120 μl de tampón de reacción y 20 μl de NADH (2,0 mM), se añadieron 150 μl de BugBuster a cada pocillo después de 30 min de calentamiento y las células se suspendieron utilizando Genmate (Tecan Systems Inc. de San José, CA.) pipeteando la suspensión de células arriba y abajo (× 5). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min y después se calentaron a 60°C durante 10 min. Los restos celulares y los precipitados de proteínas se separaron por centrifugación a 4.000 rpm durante 5 min a 25°C. Una alícuota (50 μl) del sobrenadante se transfirió a cada pocillo de placas de ensayo de 96 pocillos, la solución se mezcló y las burbujas se separaron por centrifugación a 4.000 rpm a 25°C durante 1 min. La absorbancia a 340 nm se registró como fondo, a cada pocillo se añadieron 20 μl de acetolactato (4,5 mM, diluido con tampón de reacción) y se mezclaron con agitación por el lector de placas. La absorbancia a 340 nm fue recodificado a 0, y 60 minutos después de la adición del substrato. Se utilizó la diferencia en la absorbancia (antes y después de la adición del substrato) para determinar la actividad de los mutantes. Los mutantes con mayor actividad KARI en comparación con el tipo silvestre fueron seleccionados para recribado.

Aproximadamente 5.000 clones fueron cribados para la biblioteca C y 360 de mejor desempeño fueron seleccionados para volver a cribar. Aproximadamente 92 clones fueron cribados para la biblioteca E y 16 de mejor desempeño fueron seleccionados para volver a cribar. Aproximadamente 92 clones fueron cribados para la biblioteca F y 8 de mejor desempeño fueron seleccionados para volver a cribar. Aproximadamente 92 clones fueron cribados para la biblioteca G y 20 de mejor desempeño fueron seleccionados para volver a cribar. Aproximadamente 8.000 clones fueron cribados para la biblioteca H y 62 de mejor desempeño fueron seleccionados para volver a cribar.

Para la biblioteca C, aproximadamente 360 de mejor desempeño se volvieron a cribar utilizando el mismo procedimiento que para el cribado general. Entre ellos, se seleccionaron más de 45 de mejor desempeño para volver a cribar como se describe a continuación.

Ensayo secundario de mutantes activos

5

20

25

30

35

40

45

50

55

Las células que contienen pBAD-ilvC y sus mutantes identificados por cribado de alto rendimiento se cultivaron durante la noche, a 37°C, en 3,0 ml del medio LB que contiene 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y 0,02% (peso/vol.) de arabinosa como el inductor mientras se agita a 250 rpm. Después, las células se recogieron por centrifugación a 18.000 g durante 1 min a temperatura ambiente (micro-centrífuga modelo 1-15 de Sigma, Laurel, MD.). Los sedimentos celulares se resuspendieron en 300  $\mu$ l de BugBuster Master Mix (EMD Chemicals). La mezcla de reacción se incubó primero a temperatura ambiente durante 20 min y después se calentó a 60°C durante 10 min. Los restos celulares y el precipitado de proteínas se eliminaron por centrifugación a 18.000 g durante 5 min a

temperatura ambiente.

El tampón de reacción (120  $\mu$ l), preparado como se ha descrito anteriormente se mezcló con patrón bien de NADH o bien de NADPH (20  $\mu$ l) y el extracto de células (20  $\mu$ l) en cada pocillo de una placa de ensayo 96 pocillos. La absorbancia a 340 nm a 25°C se registró como absorbancia de fondo. A continuación, 20  $\mu$ l de acetolactato (4,5 mM, se diluyeron con tampón de reacción) se añadió a cada pocillo y se mezclaron con agitación por el lector de placas. Se registró la absorbancia a 340 nm a 0 min, 2 min y 5 min después de la adición de acetolactato. Se utilizó la diferencia de absorbancia antes y después de añadir el substrato para determinar la actividad de los mutantes. Los mutantes con alta actividad se seleccionaron para la secuenciación.

Se identificaron y secuenciaron (Fig. 4) cinco de mejor desempeño de la "Biblioteca C". El de mejor desempeño era el mutante R47F/S50A/T52D/V53W, que invirtió por completo la especificidad de los nucleótidos. Los de mejor desempeño de las "Bibliotecas E, F y G" eran R47P, S50D y T52D respectivamente (Fig. 5). Para la "Biblioteca H", se identificaron y secuenciaron 5 de los de mejor desempeño (Fig. 6) y el de mejor desempeño era R47P/S50G/T52D, que también invirtió por completo la especificidad de los nucleótidos. Las enzimas que contienen actividades superiores que el fondo se consideraron positivas.

#### 15 Ensayo de la enzima KARI

20

25

30

35

40

45

50

55

La actividad de la enzima KARI se puede medir de forma rutinaria por oxidación de NADH o de NADPH como se ha descrito anteriormente, sin embargo para medir la formación del producto 2,3-dihidroxi-isovalerato directamente, el análisis de la reacción se realizaba mediante LC/MS.

La concentración de proteínas del extracto celular crudo de células lisadas Bugbuster (como se describió anteriormente) se midió utilizando el reactivo de ensayo de proteínas BioRad (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA 94547). Se añadió un total de 0,5 microgramos de proteínas del extracto crudo a un tampón de reacción que consiste en HEPES-KOH 100 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, glucosa-6-fosfato 1 mM (Sigma-Aldrich), 0,2 unidades de glucosa Leuconostoc mesenteroides 6-fosfato deshidrogenasa (Sigma-Aldrich), y diversas concentraciones de NADH o NADPH, hasta un volumen de 96 μl. La reacción se inició mediante la adición de 4 μl de acetolactato hasta una concentración final 4 mM y un volumen final de 100 μl. Después del cronometrado de incubaciones a 30°C, típicamente entre 2 y 15 min, la reacción se enfrió rápidamente mediante la adición de 10 μl de AEDT 0,5 M, pH 8,0 (Life Technologies, Grand Island, NY 14072). Para medir la K<sub>M</sub> de NADH, las concentraciones utilizadas fueron 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, y 10 mM.

Para analizar 2,3-dihidroxi-isovalerato, la muestra se diluyó 10 veces con agua, y se inyectaron 8,0 μl en un HPLC Waters Acquity equipado con espectrómetro de masas Waters SQD (Waters Corporation, Milford, MA). Las condiciones cromatográficas fueron: caudal (0,5 ml/min), en una columna HSS T3 de Waters Acquity (2,1 mm de diámetro, 100 mm de longitud). El tampón A consistía en 0,1% (v/v) en agua, el tampón B era ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo. La muestra se analizó utilizando 1% de tampón B (en tampón A) durante 1 min, seguido por un gradiente lineal de 1% de tampón B en 1 min hasta 75% de tampón B en 1,5 min. El producto de reacción, 2,3-dihidroxi-isovalerato, fue detectado por ionización a m/z = 133, utilizando el dispositivo de ionización electrospray de -30 V de voltaje de cono. La cantidad de producto 2,3-dihidroxiisovalerato se calculó por comparación con un molde auténtico.

Para calcular la K<sub>M</sub> para NADH, los datos de velocidad para la formación de DVIH eran representados gráficamente en el Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA.) y se ajustaron a la ecuación de Michaelis\_Menton de un solo substrato, suponiendo que se satura la concentración de acetolactato.

#### Ejemplo 1

Construcción de Genotecas de Saturación del Sitio

Se construyeron siete genotecas (Tabla 2) utilizando dos etapas: 1) síntesis de MegaCebadores utilizando oligonucleótidos sintetizados comercialmente descritos en la Tabla 1; y 2) construcción de genes mutados utilizando los MegaCebadores obtenidos en la etapa 1. Estos cebadores se prepararon utilizando polimerasa Pfu-Ultra de alta fidelidad (Stratagene, La Jolla, CA) para un par de cebadores que contienen un cebador directo y uno inverso. Los moldes de las bibliotecas C, E, F, G y H fueron el tipo silvestre de PF5 ilvc. Los moldes de ADN para la biblioteca N fueron los mutantes que tienen actividad NADH detectable desde la biblioteca C, mientras que los de la biblioteca O eran aquellos mutantes que tienen actividad NADH detectable desde la biblioteca H. Una mezcla de reacción de 50 นl contenía: 5.0 นl de 10 veces tampón de reacción suministrado con la Pfu-Ultra polimerasa (Stratagene), 1.0 นl de 50 ng/l de molde, 1,0 μl cada uno de 10 μmol/μl de cebadores directo e inverso, 1,0 μl de 40 mM de mezcla dNTP (Promega, Madison, WI), 1,0 μl de Pfu-Ultra ADN polimerasa (Stratagene) y 39 μl de agua. La mezcla se colocó en un tubo de 200 µl de pared delgada para la reacción de PCR en un equipo de gradiente Mastercycler (Brinkmann Instruments, Inc. Westbury, NY). Las siguientes condiciones se usaron para la reacción PCR: La temperatura de partida fue de 95°C durante 30 s seguido por 30 ciclos de calentamiento/enfriamiento. Cada ciclo consistía en 95°C durante 30 segundos, 54°C durante 1 min y 70°C durante 2 min. A la finalización del ciclo de temperatura, las muestras se mantuvieron a 70°C durante 4 minutos más, y después se mantuvieron a la espera de la recuperación de la muestra a 4°C. El producto de PCR fue limpiado utilizando un kit de limpieza de ADN (nº de Catálogo D4003, Zymo Research, Orange, CA) según lo recomendado por el fabricante.

10

15

20

Tabla 2 - Genotecas

Nombre de la biblioteca	Patrones	Posición o posiciones de direccionamiento de Pf5_ilvC	Cebadores usados
С	PF5_ilvc	47, 50, 52 y 53	ID de SEC Nº:
E	PF5_ilvc	47	ID de SEC Nº:
F	PF5_ilvc	50	ID de SEC Nº:
G	PF5_ilvc	52	ID de SEC Nº:
Н	PF5_ilvc	47, 50 y 52	ID de SEC Nº:
N	Buenos mutantes de la biblioteca C	53	ID de SEC Nº:
0	Buenos mutantes de la biblioteca H	53	ID de SEC Nº:

Los MegaCebadores se utilizaron después para generar genotecas utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II XL (nº de Catálogo 200524, Stratagene, La Jolla CA). Una mezcla de reacción de 50 μl contenía: 5,0 μl de 10 veces tampón de reacción, 1,0 μl de 50 ng/μl de molde, 42 μl de MegaCebador, 1.0 μl de mezcla dNTP 40 mM, 1,0 μl de Pfu-Ultra ADN polimerasa. Excepto por el MegaCebador y los moldes, todos los reactivos utilizados en el presente documento fueron suministrados con el kit indicado anteriormente. Esta mezcla de reacción se colocó en un tubo de PCR de capacidad 200 μl de pared delgada y se utilizaron las siguientes reacciones para la PCR: La temperatura de partida era de 95°C durante 30 s seguido por 25 ciclos de calentamiento/enfriamiento. Cada ciclo consistía en 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 min y 68°C durante 6 min. A la finalización de los ciclos de temperatura, las muestras se mantuvieron a 68°C durante 8 min más, y después se mantuvieron a 4°C para el procesamiento posterior. Enzima de restricción Dpn I (1,0 μl) (suministrada con el kit anterior) se añadía directamente a la mezcla de reacción terminada, la digestión enzimática se realizó a 37°C durante 1 hora y el producto de PCR se limpió utilizando un kit de limpieza de ADN (Zymo Research). El producto de PCR limpiado (10 μl) contenía genes mutados para una genoteca.

El producto de PCR limpiado fue transformado en una cepa electro-competente de E. coli Bw25113 ( $\Delta$ ilvC) utilizando un BioRad Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Los clones transformados fueron rayados sobre placas con agar que contenían el medio Luria Broth y 100  $\mu$ g/ml de ampicilina (nº de Catálogo L1004, Teknova Inc. Hollister, CA) y se incubaron a 37°C durante la noche. Decenas de clones fueron escogidos al azar para la secuenciación de ADN para confirmar la calidad de la biblioteca.

Tabla 3

Lista de alguno	s mutantes que tienen a	ctividades NADH identi	ficadas desde las bibliote	ecas de saturación
Mutante	Posición 47	Posición 50	Posición 52	Posición 53
SD2	R47Y	S50A	T52H	V53W
SB1	R47Y	S50A	T52G	V53W
SE1	R47A	S50W	T52G	V53W
SH2	R47N	S50W	T52N	V53W
SB2	R47I		T52G	V53W
SG1	R47Y		T52G	V53W
SB3	R47G	S50W	T52G	V53W
SE2	R47P	S50E	T52A	V53W
SD3	R47L	S50W	T52G	V53W
C2A6	R47I	S50G	T52D	V53W
C3E11	R47A	S50M	T52D	V53W
C3A7	R47Y	S50A	T52D	V53W

Mutante	Posición 47	Posición 50	Posición 52	Posición 53
C3B11	R47F	S50A	T52D	V53W
C4A5	R47Y	S50A	T52S	V53W
C3B12	R47I		T52D	V53W
C4H7	R47I		T52S	V53W
C1D3	R47G	S50M	T52D	V53W
C4D12	R47C	S50W	T52G	V53W
C1G7	R47P	S50G	T52D	V53W
C2F6	R47P	S50V	T52D	V53W
C1C4	R47P	S50E	T52S	V53W
6924F9	R47P	S50G	T52D	
6881E11	R47P	S50N	T52C	
6868F10	R47P		T52S	
6883G10	R47P	S50D	T52S	
6939G4	R47P	S50C	T52D	
11463D8	R47P	S50F	T52D	
9667A11	R47N	S50N	T52D	V53A
9675C8	R47Y	S50A	T52D	V53A
9650E5	R47N	S50W	T52G	V53H
9875B9	R47N	S50N	T52D	V53W
9862B9	R47D	S50W	T52G	V53W
9728G11	R47N	S50W	T52G	V53W
11461D8	R47F	S50A	T52D	V53A

Ejemplo 2

5

10

15

20

Construcción de bibliotecas de PCR propensas a error

Varias series de bibliotecas de PCR propensas a error (epPCR) se crearon utilizando el kit GeneMorph II (Stratagene) según lo recomendado por el fabricante. Todas las bibliotecas epPCR se dirigen al N-terminal de PF5\_KARI. El cebador directo (ID de SEC Nº: 20) y el cebador inverso (ID de SEC Nº: 22) se utilizaron para todas las bibliotecas ePCR.

Los moldes de ADN para cada biblioteca epPCR eran mutantes con relativamente buenas actividades NADH a partir de la biblioteca anterior. Por ejemplo: los moldes de ADN para la n-ésima biblioteca epPCR eran mutantes con buenas actividades de NADH a partir de la (n-1)-ésima biblioteca epPCR. Los moldes de la primera biblioteca epPCR eran mutantes con relativamente buenas actividades de NADH a partir de bibliotecas de N y O. La tasa de mutaciones de la biblioteca obtenida con este kit fue controlada mediante la cantidad de molde añadido en la mezcla de reacción y el número de ciclos de amplificación. Típicamente, se utilizó 1,0 ng de cada molde de ADN en 100 μl de mezcla de reacción. El número de ciclos de amplificación era de 70. Las condiciones siguientes se utilizaron para la reacción de PCR: La temperatura de partida era de 95°C durante 30 s seguido por 70 ciclos de calentamiento/enfriamiento. Cada ciclo consistía en 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 min, y 70°C durante 2 min. Después de que los primeros 35 ciclos de calentamiento/enfriamiento terminaron, se añadieron más dNTP y ADN polimerasa Mutazyme II. El producto de PCR se limpió utilizando un kit de limpieza de ADN (n° de Catálogo D4003, Zymo Research, Orange, CA) según lo recomendado por el fabricante. El producto de PCR limpiado se trató como megacebador y se introdujo en el vector utilizando el kit Quickchange como se describe en el Ejemplo 1. La Tabla 4 siguiente enumera los mutantes KARI obtenidos y la mejora significativa observada en sus uniones NADH. La K<sub>m</sub> se redujo desde 1.100 μM para el C3B11 mutante hasta 50 μM para 12957G9 mutante.

Tabla 4

Lista de algunos mutantes con sus valores de K <sub>m</sub> medidos			
Mutante	Posiciones de Mutación	NADH K <sub>m</sub> (μM)	
C3B11	R47F/S50A/T52D/V53W	1100	
SB3	R47G/S50W/T52G/V53W	500	
11518B4	R47N/S50N/T52D/V53A/A156V	141	
11281G2	R47N/S50N/T52D/V53A/A156V/L165M	130	
12985F6	R47Y/S50A/T52D/V53A/L61 F/A156V	100	
13002D8	R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/A156V/G170A	68	
12957G9	Y24F/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/G170A	50	
12978D9	R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/Q115L/A156V	114	

#### Ejemplo 3

10

25

30

#### Termoestabilidad de PF5-ilvC y sus mutantes

Las células que contienen pBAD-ilvC mutados se cultivaron durante la noche a  $37^{\circ}$ C en 25 ml de medio LB que contenía  $100~\mu$ g/ml de ampicilina y 0.02% (peso/vol.) de inductor de arabinosa con agitación a  $250~\rm rpm$ . Las células se recogieron después por centrifugación a  $18.000~\rm g$  durante 1 min a temperatura ambiente y los sedimentos celulares se resuspendieron en  $300~\mu$ l de BugBuster Master Mix (EMD Chemicals). La mezcla de reacción se incubó primero a temperatura ambiente durante  $20~\rm min$  y las alícuotas de esta mezcla de células (por ejemplo,  $50~\mu$ l) se incubaron a diferentes temperaturas (desde la temperatura ambiente hasta  $75^{\circ}$ C) durante  $10~\rm min$ . El precipitado se separó por centrifugación a  $18.000~\rm g$  durante  $5~\rm min$  a temperatura ambiente. La actividad remanente del sobrenadante se analizó como se describió anteriormente. Como se muestra en la Figura 7, pBAD-ilvC era muy estable con  $T_{50}$  igual a  $68^{\circ}$ C. ( $T^{50}$  es la temperatura a la cual el 50% de la proteína pierde su actividad después de  $10~\rm min$  de incubación).

La termoestabilidad de PF5-ilvC permitió la destrucción de la mayoría de la otra actividad de oxidación NADH no KARI dentro de estas células, reduciendo el consumo de fondo de NADH y facilitando de este modo los ensayos de actividad KARI. Este protocolo de tratamiento térmico se utilizó en todos los ensayos de cribado y re-cribado. Los mutantes obtenidos de este modo eran todos termoestables que permitían una más fácil selección de los mutantes deseables.

### Ejemplo 4

20 Producción estequiométrica de 2,3-dihidroxi-isovalerato por KARI durante el consumo de cofactores NADH o NADPH

Ensayos de cribado y de rutina de la actividad KARI se basan en la disminución de la absorción de 340 nm asociada con la oxidación de NADPH o NADH de nucleótidos piridina. Para asegurar que esta métrica se acoplaba a la formación del otro producto de reacción, la oxidación del nucleótido de piridina y la formación de 2,3-dihidroxi-isovalerato se midieron en las mismas muestras.

La oxidación de NADH o NADPH se midió a 340 nm en una cubeta de 1 cm longitud del trayecto en un espectrofotómetro modelo 8453 de Agilent (Agilent Technologies, Wilmington DEI.). El extracto celular crudo (0,1 ml) preparado como se describió anteriormente, conteniendo bien PF5 KARI tipo silvestre o bien C3B11 mutante, se añadió a 0,9 ml de tampón de K-fosfato (10 mM, pH 7,6), que contenía MgCl<sub>2</sub> 10 mM, y 0,2 mM de cualquiera NADPH o NADH. La reacción se inició mediante la adición de acetolactato a una concentración final de 0,4 mM. Después de una disminución de 10-20% en la absorción (aproximadamente 5 min), 50 µl de la mezcla de reacción se retiraron rápidamente y se añaden a un tubo Eppendorf de 1,5 ml conteniendo 10 µl de AEDT 0,5 mM para detener la reacción y la disminución de absorción real para cada muestra se registro con precisión. La producción de 2,3-dihidroxi-isovalerato se midió y se cuantificó mediante LC/MS como se describió anteriormente.

La relación de acoplamiento se define por la relación entre la cantidad de 2,3-dihidroxiisovalerato (DHIV) producido y la cantidad de NADH o NADPH consumida durante el experimento. La relación de acoplamiento para la enzima de tipo silvestre (PF5-ilvC), utilizando NADPH, era de 0,98 DHIV/NADPH, mientras que para el mutante (C3B11), utilizando NADH, era, en promedio, de alrededor de 1,10 DHIV/NADPH.

#### Eiemplo 5

5

10

15

20

Identificación de los aminoácidos implicados en la unión del cofactor en KARI para conmutar la especificidad del cofactor utilizando herramientas bioinformáticas

Para descubrir si las secuencias KARI existentes en la naturaleza podrían proporcionar pistas para las posiciones de aminoácidos que deberían ser objeto de mutagénesis, se realizó el alineamiento múltiple de secuencias (MSA) utilizando PF5-KARI, su cercano homólogo PA01 KARI y tres secuencias KARI con actividad NADH medible, es decir, B. Cereus ilvC1 e ilvC2 y espinaca KARI (Fig. 8). Sobre la base del alineamiento múltiple de secuencias, las posiciones 33, 43, 59, 61, 71, 80, 101, y 119 fueron seleccionados para la mutagénesis de saturación. Mutagénesis de saturación en todas estas posiciones se realizó simultáneamente utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II XL (nº de Catálogo 200524, Stratagene, La Jolla CA) con el protocolo sugerido por el fabricante. El material de partida para esta mutagénesis era un molde mixto consistente en mutantes ya identificados en la Tabla 4 y en el Ejemplo 2. Los cebadores utilizados se enumeran en la Tabla 5. La biblioteca de mutantes obtenidos de este modo fueron nombrados biblioteca Z". Los mutantes con buena actividad NADH de esta biblioteca se identificaron utilizando cribado de alto rendimiento y su actividad KARI y la K<sub>m</sub> para NADH se midieron como se describió anteriormente. Estos mutantes (enumerados en la Tabla 6) poseen K<sub>m</sub> mucho menores para NADH en comparación con los moldes de los padres (Tabla 4). Se creó un megacebador utilizando cebadores (ID de SEC Nº. 20 y 58) y mutaciones en las posiciones 156 y 170 fueron eliminadas. El cribado posterior de este conjunto de mutantes identificó el mutante 3361 G8 (ID de SEC Nº: 67) (Tabla 7). Los aciertos de la biblioteca Z fueron sometidos además a mutagénesis de saturación en la posición 53 utilizando cebadores (ID de SEC Nº 20 y 21), y el cribado posterior identificó los mutantes restantes en la Tabla 7. Como se muestra en la Tabla 7. los nuevos mutantes poseían mucha menor K<sub>m</sub> para NADH (p. ej., 4,0 a 5,5 μM) en comparación con los mutantes enumerados en la Tabla 6 (p. ej., 14-40

Tabla 5

	Cebadores para el Ejemplo 5
Posición o Posiciones dirigidas de Pf5_ilvC	Cebadores
33	pBAD-405-C33_090808f: GCTCAAGCANNKAACCTGAAGG (ID de SEC N°: 49) pBAD-427-C33_090808r: CCTTCAGGTTKNNTGCTTGAGC (ID de SEC N°: 50)
43	pBAD-435-T43_090808f:GTAGACGTGNNKGTTGGCCTG (ID de SEC N°: 51) pBAD-456-T43_090808r:CAGGCCAACKNNCACGTCTAC (ID de SEC N°: 52)
59 y 61	pBAD-484-H59L61_090808f:CTGAAGCCNNKGGCNNKAAAGTGAC (ID de SEC N°: 53) pBAD-509-H59L61_090808r:GTCACTTTKNNGCCKNNGGCTTCAG (ID de SEC N°: 54)
71	pBAD-519-A71_090808f: GCAGCCGTTNNKGGTGCCGACT (ID de SEC Nº: 55) pBAD-541-A71_090808r: AGTCGGCACCKNNAACGGCTGC (ID de SEC Nº: 56)
80	pBAD-545-T80_090808f: CATGATCCTGNNKCCGGACGAG (ID de SEC Nº: 57) pBAD-567-T80_090808r: CTCGTCCGGKNNCAGGATCATG (ID de SEC Nº: 58)
101	pBAD-608-A101_090808f: CAAGAAGGGCNNKACTCTGGCCT (ID de SEC Nº: 59) pBAD-631-A101_090808r: AGGCCAGAGTKNNGCCCTTCTTG (ID de SEC Nº: 60)
119	pBAD-663-R119_090808f: GTTGTGCCTNNKGCCGACCTCG (ID de SEC Nº: 61) pBAD-685-R119_090808r: CGAGGTCGGCKNNAGGCACAAC (ID de SEC Nº: 62)

Tabla 6

Lista de algunos mutantes con sus valores de K <sub>m</sub> medidos (las posiciones mutadas en esos mutantes se identificaron mediante herramientas bioinformáticas)			
Mutante	Posiciones de la Mutación	NADH K <sub>m</sub> (µM)	
ZB1	Y24F/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/A156V (ID de SEC Nº: 24)	40	
ZF3	Y24F/C33L1R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F (ID de SEC Nº: 25)	21	
ZF2	ZF2 Y24F/C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/A156V (ID de SEC Nº: 26)		

Lista de algunos mutantes con sus valores de K <sub>m</sub> medidos (las posiciones mutadas en esos mutantes se identificaron mediante herramientas bioinformáticas)			
Mutante         Posiciones de la Mutación         NADH K <sub>m</sub> (μΜ)			
ZB3	17		
Z4B8	C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/T80I/A156V (ID de SEC Nº: 28)	14	

Tabla 7

Los mutantes optimizados adicionalmente para mejorar la $K_{m}$ (para NADH)		
Mutante	Posiciones de la Mutación	NADH K <sub>m</sub> (µM)
3361 G8	C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/T80I (SEQ ID NO: 67)	5.5
2H10	Y24F/C33L/R47Y/S50A/T52D/V53I/L61F/T80I/A156V (SEQ ID NO : 68)	5.3
1D2	Y24F/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61F/T80I/A156V (SEQ ID NO: 69)	4.1
3F12	Y24F/C33L/R47Y/S50A/T52D/V53A/L61 F/T80I/A156V (SEQ ID NO: 70)	4.0

Análisis adicionales utilizando herramientas bioinformáticas se realizaron, por tanto, para expandir los sitios mutacionales a otras secuencias KARI como se describe a continuación.

#### Análisis de secuencias

Los miembros de la familia de proteínas de cetol-ácido reductoisomerasa (KARI) fueron identificados a través de búsquedas BlastP de bases de datos disponibles al público utilizando la secuencia de aminoácidos de Pseudomonas fluorescens PF5 KARI (ID de SEC Nº: 17) con los siguientes parámetros de búsqueda: valor de E = 10, tamaño de la palabra = 3, Matriz = Blosum62, y apertura del Hueco = 11 y por extensión de hueco = 1, valor E de corte de 10<sup>-3</sup>. Se eliminaron las secuencias idénticas y las secuencias que eran más cortas que 260 aminoácidos. Además, también se eliminaron las secuencias que carecían del típico motivo GxGXX(G/A) involucrado en la unión de NAD(P)H en el dominio N-terminal. Estos análisis dieron como resultado un conjunto de 692 secuencias de KARI.

Un perfil de HMM se generó a partir del conjunto de las enzimas KARI Clase I y Clase II verificadas experimentalmente a partir de diversas fuentes, como se describe en la Tabla 8. A continuación se proporcionan los detalles de construcción, calibración, y búsqueda con este perfil de HMM. Cualquier secuencia que pueda ser recuperada por la búsqueda de HMM utilizando el perfil de HMM para KARI a un valor E por encima de 1E-3 se considera un miembro de la familia KARI. Las posiciones en una secuencia KARI alineada con los siguientes en los nodos del perfil de HMM (definidas a continuación en la sección de construcción del perfil de HMM) se reivindica de que son responsables de la utilización de NADH: 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156, y 170 (la numeración se basa en las secuencias de Pseudomonas fluorescens PF5 KARI).

#### 20 Preparación del Perfil de HMM

15

25

30

Un grupo de secuencias KARI se expresaron en E. coli y se ha verificado que tienen actividad KARI Estas KARI se enumeran en la Tabla 6. Las secuencias de aminoácidos de estas KARI funcionales verificadas experimentalmente fueron analizadas utilizando el paquete de software HMMER (la teoría tras los perfiles HMM se describe en R. Durbin, S. Eddy, A. Krogh y G. Mitchison, Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids, Cambridge University Press, 1998; Krogh et al, 1994; J. Mol Biol. 235: 1501-1531), siguiendo la guía del usuario que está disponible de HMMER (Janelia Farm Research Campus, Ashburn, VA). La salida del programa de software HMMER es un perfil de Modelo Oculto de Markov (perfil HMM) que caracteriza las secuencias de entrada. Como se indica en la guía del usuario, los perfiles HMM son descripciones estadísticas del consenso de un alineamiento múltiple de secuencias. Utilizan las puntuaciones específicas de la posición de los aminoácidos (o nucleótidos) y las puntuaciones de la posición específica para la apertura y extensión de una inserción o eliminación. En comparación con otros procedimientos basados en el perfil, los HMM tienen una base probabilística formal. Los perfiles HMM para un gran número de familias de proteínas están disponibles al público en la base de datos PFAM (Janelia Farm Research Campus, Ashburn, VA.).

El perfil HMM se construyó de la forma siguiente:

#### 35 Etapa1. Construir un alineamiento de secuencia

Las 25 secuencias para las KARI funcionalmente verificada enumeradas anteriormente se alinearon utilizando Clustal W (Thompson, J.D., Higgins, D.G., y Gibson T.J. (1994) Nuc Acid Res. 22: . 4673-4680) con los parámetros por defecto. El alineamiento se muestra en la Figura 9.

Tabla 8
25 enzimas KARI verificadas experimentalmente

Número GI	Acceso	ID de SEC Nº:	Organismo
70732562	YP_262325.1	17	Pseudomonas fluorescens Pf-5
15897495	NP_342100.1	13	Sulfolobus solfataricus P2
18313972	NP_560639.1	14	Pyrobaculum aerophilum str. IM2
76801743	YP_326751.1	30	Natronomonas pharaonis DSM 2160
16079881	NP_390707.1	31	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168
19552493	NP_600495.1	32	Corynebacterium glutamicum ATCC 13032
6225553	032414	33	Phaeospririlum molischianum
17546794	NP_520196.1	15	Ralstonia solanacearum GMI1000
56552037	YP_162876.1	34	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4
114319705	YP_741388.1	35	Alkalilimnicola ehrlichei MLHE-1
57240359	ZP_00368308.1	36	Campylobacter lari RM2100
120553816	YP_958167.1	37	Marinobacter aquaeolei VT8
71065099	YP_263826.1	38	Psychrobacter arcticus 273-4
83648555	YP_436990.1	39	Hahella chejuensis KCTC 2396
74318007	YP_315747.1	40	Thiobacillus denitrificans ATCC 25259
67159493	ZP_00420011.1	41	Azotobacter vinelandii AvOP
66044103	YP_233944.1	42	Pseudomonas syringae pv. syringae B728a
28868203	NP_790822.1	43	Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000
26991362	NP_746787.1	44	Pseudomonas putida KT2440
104783656	YP_610154.1	45	Pseudomonas entomophila L48
146306044	YP_001186509.1	46	Pseudomonas mendocina ymp
15599888	NP_253382.1	16	Pseudomonas aeruginosa PAO1
42780593	NP_977840.1	47	Bacillus cereus ATCC 10987
42781005	NP_978252.1	48	Bacillus cereus ATCC 10987
266346	Q01292	18	Spinacia oleracea

Etapa 2. Crear un perfil HMM

5

10

15

El programa hmmbuild se ha ejecutado en el conjunto de secuencias alineadas utilizando parámetros por defecto. El hmmbuild lee el archivo del alineamiento múltiple de secuencias, construye un nuevo perfil HMM, y guarda el perfil HMM para archivar. Utilizando este programa se generaba un perfil no calibrado a partir del alineamiento múltiple de secuencias para veinticuatro KARI verificadas experimentalmente como se describió anteriormente.

La siguiente información basada en la guía de usuario del software HMMER da alguna descripción de la forma en que el programa hmmbuild prepara un perfil HMM. Un perfil HMM es una máquina de estado lineal que consiste en una serie de nodos, cada uno de los cuales corresponde aproximadamente a una posición (columna) en el alineamiento múltiple de secuencias a partir del cual se construye. Si se ignoran los huecos, la correspondencia es exacta, es decir, el perfil HMM tiene un nodo para cada columna en el alineamiento, y cada nodo puede existir en un estado, un estado coincidente. La palabra "coincidente" en el presente documento implica que hay una posición en el modelo para cada posición en la secuencia para ser alineada con el modelo. Los huecos se modelan mediante estados de inserción (I) y de eliminación (D) estados. Todas las columnas que contienen más de una cierta fracción x de caracteres huecos serán asignadas como una columna de inserción. Por defecto, x se establece en 0,5. Cada estado coincidente tiene un estado I y uno D asociados con él. HMMER llama a un grupo de tres estados (M/D/I) en la misma posición de consenso en el alineamiento de un "nodo".

Un perfil HMM tiene varios tipos de probabilidades asociadas con él. Un tipo es la probabilidad de transición -- la probabilidad de transición de un estado a otro. También hay probabilidades de emisiones asociadas con cada

estado coincidente, basada en la probabilidad de que un determinado resto exista en esa posición en el alineamiento. Por ejemplo, para una columna bastante bien conservada en un alineamiento, la probabilidad de emisiones para el aminoácido más común puede ser 0,81, mientras que para cada uno de los otros 19 aminoácidos puede ser 0,01.

Un perfil HMM está completamente descrito en un archivo guardado con perfil HMMER2, que contiene todas las probabilidades que se utilizan para parametrizar el HMM. Las probabilidades de emisión de un estado coincidente o un estado de inserción se almacenan como relaciones log-momios relativas a un modelo Null: log<sub>2</sub> (p\_x)/(null\_x). Donde p\_x es la probabilidad de un resto de aminoácido, en una posición particular en el alineamiento, de acuerdo con el perfil HMM y null\_x es la probabilidad de acuerdo con el modelo Null. El modelo Null es un simple modelo probabilístico de un estado con un conjunto precalculado de probabilidades de emisión para cada uno de los 20 aminoácidos derivados de la distribución de los aminoácidos en el SWISSPROT release 24. Las puntuaciones de la transición de estado también se almacenan como parámetros log momios y son proporcionales a log<sub>2</sub> (t\_x). Donde t x es la probabilidad de transición de transitar de un estado a otro estado.

### Etapa 3. Calibrar el perfil HMM

40

50

El perfil HMM se leyó utilizando hmmcalibrate que anota un gran número de secuencias aleatorias sintetizadas con el perfil (el número por defecto de secuencias sintéticas utilizada es 5.000), se ajusta a una distribución de valor extremo (EVD) para el histograma de esas puntuaciones, y vuelve a guardar el archivo HMM incluyendo ahora los parámetros de EVD. Estos parámetros de EVD (μ y λ) se utilizan para calcular los valores de E de las puntuaciones de bits cuando el perfil se busca contra una base de datos de secuencias de proteínas. El hmmcalibrate escribe dos parámetros en el archivo HMM en una línea etiquetada "EVD": estos parámetros son los parámetros μ (localización) y λ (escala) de una distribución de valor extremo (EVD) que mejor se adapte a un histograma de las puntuaciones calculadas sobre secuencias generadas al azar de aproximadamente la misma longitud y composición del resto como SWISS-PROT. Esta calibración se hizo una vez para el perfil HMM.

El perfil HMM calibrado para el conjunto de secuencias KARI se proporciona adjunto a ello como un gráfico Excel del perfil HMM (Tabla 9). En la sección principal del modelo empezando desde la línea de marca del HMM, el modelo tiene tres líneas por cada nodo, para Inodos M (donde M es el número de estados coincidentes, como se determina mediante la línea LENG). La primera línea informa de las puntuaciones log-momios de emisión coincidente: la relación log-momios de emisión de cada aminoácido desde ese estado y desde el modelo Null. El primer número es el número de nodo (1..M). Los K siguientes numeran las puntuaciones de emisión coincidente, una por cada aminoácido. El aminoácido con mayor puntuación se indica entre paréntesis después del número de nodo. Estas puntuaciones log-momios se pueden transformar de nuevo en probabilidades HMM utilizando el la probabilidad del modelo Null. El último número de la línea representa el índice de la columna de alineamiento para este estado coincidente. La segunda línea informa de las puntuaciones de emisión del inserto, y la tercera línea informa de las puntuaciones de transición de estado: M → M, M → I, M → D; I → H, I → I; D → M, D → D; B → M; M → E.

35 Etapa 4. Ensayar la especificidad y sensibilidad de los HMM del perfil construido

El perfil HMM se evaluó utilizando hmmsearch, que lee un perfil HMM a partir de hmmfile y busca un archivo de secuencia para coincidencias de secuencias significativamente similares. El archivo de secuencia buscado contenía 692 secuencias (véase en lo que antecede). Durante la búsqueda, el tamaño de la base de datos (parámetro Z) se fijó en mil millones. Este ajuste del tamaño asegura que valores E significativos frente a la base de datos actual seguirán siendo significativos en un futuro previsible. El punto de corte del valor E se fijó en 10.

Una búsqueda hmmer, utilizando hmmsearch, con el HMM perfil generado a partir del alineamiento de los veinticinco KARI con la función verificada experimentalmente, hizo coincidentes las 692 secuencias con un valor de E <10<sup>-3</sup>. Este resultado indica que los miembros de la familia KARI comparten una significativa similitud de secuencia. Se utilizó una búsqueda hmmer con un corte de valor de E de 10<sup>-3</sup> para separar las KARI de otras proteínas.

45 Etapa 5. Identificar posiciones que son relevantes para la utilización de NAD(P)H.

Once posiciones se han identificado en KARI de Pseudomonas fluorescens Pf-5 que conmuta el cofactor NADPH por NADH. Dado que las secuencias KARI comparten significativa similitud de secuencias (como se describió anteriormente), se puede razonar que las posiciones homólogas en la alineamiento de secuencias KARI deben contribuir a la misma especificidad funcional. El HMM perfil para enzimas KARI se ha generado a partir del alineamiento múltiple de secuencias que contiene la secuencia de Pseudomonas fluorescens Pf-5 KARI. Las once posiciones en el perfil HMM que representan las columnas del alineamiento que corresponden a las once posiciones de conmutación del cofactor en Pseudomonas fluorescens Pf-5 KARI se identifican como las posiciones 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156 y 170. Las líneas correspondientes a estas posiciones en el archivo del modelo se resaltan en amarillo en la tabla 9.

Para cualquier secuencia de consulta, hmmsearch se utiliza para buscar el perfil HMM para KARI frente a la secuencia de consulta y el alineamiento de la consulta con el HMM se registra en el archivo de salida. En la sección de alineamiento de la salida, la línea superior es el consenso HMM. El aminoácido mostrado para el consenso es el aminoácido de mayor probabilidad en esa posición de acuerdo con el HMM (no necesariamente el aminoácido de

puntuación más alta). La línea central muestra letras de coincidencia "exacta" con el resto de mayor probabilidad en el HMM, o un "+" cuando la coincidencia tiene una puntuación positiva. La tercera línea muestra la propia secuencia. Las posiciones en la secuencia de consulta que se consideran como relevantes para la conmutación del cofactor se identifican como aquellas que están alineadas con estos once nodos en el perfil HMM como se describió anteriormente. Un ejemplo del alineamiento de Pseudomonas fluorescens Pf-5 KARI con el perfil HMM de KARI se muestra en la Figura 10 y las once posiciones que son responsables de la conmutación del cofactor están sombreadas en gris.

5

#### Tabla 9

HMMER2.0 [2.2 g] NOMBRE de las KARI verificadas funcionalmente

LENG 354 ALPH Amino

MAPA "yes"

COM hmmbuild-n KARI verificadas funcionalmente exp-KARI.hmm exp-KARI\_mod.aln

COM hmmcalibrate exp-KARI.hmm

NSEQ 25

FECHA Lun Dic 8 17: 34: 51

XT -8455 -1000 -1000 -8455 4 --8455 -

NULT -4 -8455

NULE 595 -1558 85 338-294 453-1158 197 249 902-1085-142-21-313 45 531 201 384-1 998-644

EVD -333.712708 0.110102

Versión del formato de archivo: un identificador único para este formato de archivo de guardar. Nombre del perfil HMM

Longitud del modelo: el número de estados coincidentes en el modelo.

Alfabeto de símbolos: Esto determina el alfabeto de símbolos y el tamaño de las distribuciones de probabilidad de emisión de símbolos. IAmino, el tamaño del alfabeto se establece en 20 y el alfabeto de símbolos a "ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY" (orden alfabético).

Marca de anotación del mapa: Si se establece en "yes", cada línea de datos para el estado coincidente/columna de consenso en la sección principal del archivo es seguido de un número extra. Este número da el índice de la columna del alineamiento de la que se producía el estado coincidente. Esta información proporciona un "mapa" de los estados coincidentes (1..M) sobre las columnas del alineamiento (1..alen). Se utiliza para alinear rápidamente el modelo de vuelta al alineamiento original, p. ej., cuando se utiliza hmmalign-mapali.

Línea de comandos para cada comando HMMER que modifica el archivo de guardar: Esto significa que hmmbuild (parámetros por defecto) se aplicaba para generar el archivo de guardar.

Línea de comandos para cada comando HMMER que modifica el archivo de guardar: Esto significa que hmmcalibrate (parámetros por defecto) se aplicaba al archivo de guardar.

Número de secuencia: el número de secuencias en las que era entrenado el HMM

Fecha de creación: Cuando fue generado el archivo de guardar.

Ocho transiciones "especiales" para el control de partes de partes específicas del algoritmo del modelo Plan7. La probabilidad Null utilizada para transformarlos de vuelta a las probabilidades del modelo es 1,0. El orden de los ocho campos es  $N \rightarrow B$ ,  $N \rightarrow N$ ,  $E \rightarrow C$ ,  $E \rightarrow J$ ,  $C \rightarrow T$ ,  $C \rightarrow C$ ,  $J \rightarrow B$ ,  $J \rightarrow J$ .

La distribución de probabilidad de transición para el modelo Null (estado G único).

Los parámetros de distribución de valor extremo  $\mu$  y lambda, respectivamente; ambos valores puntuales flotantes. Estos valores se establecen cuando se calibra el modelo con hmmcalibrate. Se utilizan para determinar valores E de las puntuaciones de bits.

AMM	ا	_	n	_	2	6				. 1	u		Q		s	1	y.	100			Posición en alineamiento
111124	/b->m	m->i	⊞->q	l->m	->   ->		d->d	0->M	/n->e	- 1	л: ре		Ju	- 10	Ja		0		1		·
	-650	_	-146			, , , , ,													* -		
(Q)	-64	-135	-136	. 4	4 145	1166	-219	-1455	321	-1417	-911	-227	-1496	3263	122	-643	-684	-1239	-1542	-1030	7100%
	-145							-626		-466	-720	275	. , 394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	- 38	-584	-686	-69	4 -111	-701	-1378	-650												, ;	
(M)	423	392	-5216	-540	2 -343	4370	4528	-3232	-5113	2513	5320	-5052	-4790	-4977	-4B23	4692	-4459 .	-3629	4103	-4017	7290%
	-147	50	232	4	2 -38	397	104	-525	209	-467	-722	276	396	44	.95	361	121	-368	-296	-251	
	330	-33 N	-325	-347	3 -13	-701	-1378														
(F)	-1306	-110	-222	-212	0, 361	2093	-244	-196	-1891	.64	66	-1526	-2278	-1503	-1798]	-1617]	1350	4389)	305	- 1335	-88007
3/	-149							-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-38								1												
/A1	1 (44	471	445		2 004	1846	~4	4666	627	1786	-911	-252	-1658	154	-383	-488	640	-3	-2038	-1421	8700%
(A)	1616				3 -201			-1686 -616	937 210	-1765 -466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-2030	-249	67007
<del></del> -	-901						314	-070	1 210	400	-120	4/4	937	40	30	399	11/1	-003	*234	-243	
	-30	140	-114		1 -111	-2302	-314														,
(C)	-346	2576	1084	-71	2 209	-1540	-384	-167	-624	432	125	-731	-1705	-461	-893	-631	-338	-50	-771	-133	8800%
	-149	-500	235	. 4	3 -38	398	106	-626	210	-466	-721	275	394	45	96	359	118	-359	-295	-249	
	-1009	-1006	-7567	-13	352	-1916	-444	<u>'</u>	۱.												
(S)	800	-588	-1937	-141	5 -62	-1740	-954	1279	-1204	-684	19	-1258	-1964	-1013	1350	1715	475	1117	-1320	-938	9000%
-	-149							-628	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-17		-79%		-111	-146	-3378		1												
(K)	·956	-2411	-803	50	1 -274	-1919	-558	-2483	2435	-2420	-1502	57	-2010	1146	458	829	224	-2040	-2577	-1913	9100%
19.	149							-626	210	-466	-720	275	394	45	961	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139					-1378													•	
n.h	3,77	201/	E000	/76	n 142	1700	2204	294 (	1671	li aj	-1318	-4442	4600	-4417	-4528	-4080	-82	3033	-3952	-3510	9200%
(V)	-2472						-4391) 106	2241 -626	-4574) 210	-151) -465	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-3904	-249	24907
	198	-8139					-1378	*020	1 10	1000	*120	210	***	70	40	000		*300	-101	-2-10	
		*0100	-3101	-03	7 -111	-101	-10101														

9(Y)	-4673	-3685	-5210	-5505	2423	-5069	-1332	-3424	-5065	-392	-2838	-3728	-4920	-3835	-4458	-4313	-4533	-3643	-581	4349	02048/
-	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-486	-720	275	394	45	96	359	. 117	-369	-294	-249	9300%
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376							,,,,	<del></del>	****		77.14			
10(Y)	-2170	-2626	-2419	-2097	-1555	-2986	-1481	-2628	906	-2674	-2098	-2051	-3206	-1513	-107B	-2258	1039	-2435	-2009	4185	9400%
	-143	-500 -6139	233 -9181	43 -894	-381 -1115	399 -701	106	-526	210	-466	-720	275	384	45	98	359	117	-369	-294	-249	
		70104	-5/10/5	-1007	-1114	-101	-1016														
11(D)	-2498	-4412	3500	1042	-4581	-2437	-1765	-4500	733	-4361	-3682	515	-2961	-1429	-2799	-2168	-2658	-3974	-4550	-3541	9509%
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	-249	
•	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	1													
49/81	11	-2371	3/8	819	-2692	-535	-527	-2443	2294	-2387	1461	590	-1960	60	ovil	67	027	4000	AEE4	1074	onsone
12(K)	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	-68 45	904	-67 369	-837 117	-1993 -369	-2554 -294	-1871 -249	9600%
.	-8	-8139	-9131	-894	-1115	-701	-1378			100	7201		074	77	: •	800	(11)	-994	-201	270	
13(D)	-2663	4633	3700	580	4789	-2487	-1872	-4738	731	-4578	-3963	-1073	-3046	-1551	-2987	2292	-2742	-4201	4759	-3709	9701%
-	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-363	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376														
14(C)	2503	3193	4296	-3B18	-2010	-3276	-2896	762	-3517	-1437	-1051	-3233	-3509	-3212	3411	-2499	-1792	1507	-2796	-2431	9800%
	-149	-500	233	43	381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117)	-369	-294	-249	
. ]	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
(65) T	- Janes	- MAZI	ATIO	744	0000	laren.	- Acad	AA35	200	5016	4860	(594)			2.408	70			annal	2210	
15(D)	-1363 -149	-2905 -500	2748 233	542 43	-3202 -381	-2072 399	-920 106	-2977 -626	290 210	-2912 -466	-2023 -720	1270 276	-2294 394	-489 45	-1 186 96	53 359	1116	-2518 -359	-3086 -294	-2349 -249	9900%
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	1020	210	400	-140	419	334	47)	20	27.0	1111	-203	-234	-243	
		0104	VIVI	Anil	1115	- 701	10101														
16(L)	-1268	-1113	-3338	-54)	-1057	-2827	-1716	569	-2409	2299	-236	-2381	-2862	·2089	-2316	-232	-1213	1306	-1645	-1304	10000%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	8	-8 39	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
17(S)	-1350	-2877	588	1045	-3189	-496	-920	-2963	-628	-2901	-2011	1860	-2239	-489	-1184	2139	190	-2503	-3077	-2343	10100%
.,,,,,	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	19100 10
,	-2336	-8139	-325	-894	-1115	-701	-1378	1													
18(G)	-454	-332	-968	-9110	-2112	3143	-1211	-2091	-1317	-2264	-1691	-978	-1439	-1202	-1421	-646	-774	-1650	-1916	-1919	10200%
-	-149 -38	-500 -5840	233 -5882	-B94	-381 -1115	399 -3098	106 -179 °	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
	***	-3010	-5002	-031	-1119	-0000	-119												<del>,</del>		
19(H)	-898	-1313	-545	482	-320	-1336	4297	-1652	-160	-1493	-1035	-579	-1675	363	-322 96	-934	-951	-1354	-726	107	10300%
	-149	-\$00	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	234	-249	
	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-179 1														
10/75	-872	-1812	3234	432	224	-967	-433	-2172	-569	2269	-1704	99]	-1453	-184	-1141	-728	973	-1814	-2146	-1645	10400%
20(D)	-149	-500	233	43	-2215 -381	399	106	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	10440.5
	•38	-5840	-6882	-891	-1115	-3098	179		-	727	tav <sub>i</sub>			- '9	**1	244		744			
11(E)	-766	-1695	521	2B31	-2050	-1029	-293	-1804	·118	-1919	-1331	89	-1441	-4	-527	-653	-814	-1512	-1968	-1505	10500%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-628	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-38	-5840	-5682	-894	-1115	-3098	-179	<u> </u>													
22(Y)	-1337	-1228	-1681	-1556	1268	-1957	121	-518	-1294	-769	-585	-1229	-2163	-1111	-1301	-1443	-1359	-932	592	3932	10500%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-38	-5840	-6082	-894	-1115	-109	-3775	ľ													
	A4-1					je sul	Ac!	arest.	Annal	17.7.5	85.1	2000	61	Apen	ANIA	ALC:	6412	ages!	Ann il	6055	/#81481
3(1)	-2294	-1931	-4749	-4227	-1724 -381	-1227 399	-3320 106	2306 -626	-3952 210	1990	-634 -720	-3878 275	394	-3538 45	-3812	-3411 359	-2247 117	1576	-2991 -294	-2629 -249	10710%
	-119	-500	233	43	-381	399	100	+020	210	1480	•1ZU	215	124	40	96	203	11/1	-369	-£34	-243	

F	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376			L											
440	2004	600C)	EARC	Social	2400	Estel	read	3051]	4000	4500	ocol	Acod	4700	eres.	(010)	1102	-2764	1435	-3781	-3585	10800%
24(1)	-2801 -149	-2299 -500	-5406 233	-5003 43	-2108 -391	-5164 399	4649	-626	-4886 210	1593 -466	-863 -720	4829 275	-4788 394	-4454 45	-1829 98	4493	117	-369	-294	-249	1000074
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
05.05	024	eciel	200	1801		- ·	740		2010	ocid	G26	930	0014	4161	C el	14001	1154	2000	0720	7476	400040
25(K)	-234 -149	-2632 -500	306 233	-500 43	-3007 -381	-2141 399	-719 108	-2712 -626	2540 210		-1730 -720	-778 275	-2231 394	2257 45	958 98	-1109 359	-1152 117	-2288 -369	-2738 -294	-2136 -249	10900%
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376														
	arad		- TAR	100	4474	annal .	irael	(0.00)	4616		94779	cen	40.44		Ancal	(acal		1000	:	2000	4400000
26(G)	-2184 -149	-3900 -501	796 233	392 42	4174 -375	2903 399	-1580 104	-4030 -625	-1635 210	-3937 -453	·3173	-957 276	-2810 <u>-</u> 396	44	-2352 96	1069 358	-2220 116	-3530 -371	-4130 -236	-3229 -251	11000%
-	-155	-3318	-9181	3674	-118	-701	-1378							• • •				<u> </u>			
477.00	-	4111	1146	Atea	174	wat	laat v	10041	0000	A0/3	4000	A4A4	AFAN	4676	1040	0410	0078	00(7)	Annel	9074	COPAGE
27(K)	-3243 -149	-3775 -500	4123	-2558 43	-4750 -381	-3647 399	-1490 108	-4021 -626	3681 210	-3617 -466	-2982 -720	-2368 276	-3580 394	-1076 45	1318	-3119 359	-2876 117	-3817 -369	-3396 -294	-3374 -249	12600%
	-8	-8139	-9161	-894	-1115	-701	1370				·					***					
200	4004		4000	Awal		arari	- 601	const	A222	A41-H	Annal	400	- aran	1501	-	read	40.1	2015	aggel		- connect
28(K)	-1584 -149	-2925 -500	-1665 233	-979 43	-3407 -381	·2535	-923 106	-3021 -626	2737 210	•2865 •466	-2032 -720	202 275	-2582 394	1301 45	804 96	-1564 369	1681	-2645 -359	-2905 -294	-2448 -249	12700%
F	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	1376									***1			-:-		15
20/10	Acasi	0400	Ennot	4000	4204	Eanel	Emal	กากป	inie	4EAM	4171	ATION	Aprol	10001	Eanal	1400	2014	1010	460cl	acod	4000404
29(V)	-2623 -149	-2122 -500	-5300 233	4990 43	-2769 -381	-5101 399	-5131 10E	2388 -626	4945 210	-1532 -466	-1474 -720	-4790 275	-4868 394	-4890 -45	-5101 96	-4482 359	-2619 117	-3219 -359	-4505 -294	3990 -249	12800%
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376				,20						,,,,				
	4000	4000	/Aml	44841	1400	OPA	4419	121म		(48)	A (00)		4001	Asoll	48491		PA	4017	10.10	1506	
30(A)	3309 -149	-1828 -500	-4057 233	4294	-4382 -381	656 399	-3657 106	-4147 -626	4169	-4428 -466	-3497 -720	-2821 275	-2904 394	-3694 45	-3937 98	-1470 359	59 117	-2957 -369	-4610 -294	-4522 -249	12900%
-	-8	-8139	-9181	-694	-1115	-701	-1376				180			, v	•						
2440	-2525	0100	-5304	-4993	-2772	-5111	euel	2881	4950	4520	4171	ATOL	-4673	·4896	6400	1100	wad		4E tol	3997	400000
31(V)	-149	-2122 -500	233	43	-381	399)	-5142 108	-626	210	-1532 -466	-1474 -720	-4798 275	394	45	-5108 98	·4492	-2621 117	-369 -369	-4512 -294	- 249	13000%
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376														
32(i)	-2790	-2287	-5403	-5003	-2155	-5170)	-4698	3324	4899	1175	-912	-4835	-4802	-4495	-4860	-4506	-2757	1192	-3838	-3622	13100%
· .	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	1310076
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														<u> </u>
33(G)	-4435	4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6527	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	·5546	-5385)	4727	4815	-5862	-4924	-5849	1220607
20(0)	-149	-500	233	43	381	399	186	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-359	294	-249	13200%
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-13781	·					·					<u> </u>			
30VE:	(*************************************	n and a	35.8000E	ELECTRIC .	2727000	Contact.	222 Santi	er sandel	er e e e	in the	E76944412	200	273 <b>56</b> 0 5	(2344)	::::::::::::::::::::::::::::::::::::::	Mare!	S Diction 3	019664151	~ `\%ooc!``	e Mentico	NO CCT.
1341 77	149	n -500	64.6233 A	3 11843 ·	×5438)	on 300 a	106	i ≥ 626 .	<b>\$210</b>	1-1-1-466	£ . 60, 720 .:	776	394	1.85546 G	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	369	14 s 17 rs	359	2634 <b>-294</b> %	8.54-249	etitio des
Garage St.	ការការ មិន	::"8130 :	***91B1	27,894	: 1115°	701	11378	Willey !	57.03.33 52.03.34	necku) Light	13.00 mg/s	erenie Erenie	१८ दतः स्रीतः १९७१ १५ ५	14,1374. 14,1374.	erantia Ottober	HI TO	10.00	पुरुष तर्	4.167)	0.001 De	सामानाम् सामानाम्
35(G)	4135	4203	-5092	-5462	-5833	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	5546	-5385	-4727	4815	-5862	-4924	-5849	13400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	36	359	117	-369	-294	-249	· (STEE II)
•	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	·1378 °			<u>.</u>									,		·
35(S)	-1473	-2007	-3647	-3780	-3430	-2363	-3314	228	-3616	-3373	-2876	-2840	-3093	-3395	-3541	3475	-1885	-2307	-3927	3474	13500%
•	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	276	394	45	95	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376	1					•								
37(Q)	-4589	4392	-3927	4146	-5099	-4221	-4099	-5973	-3840	-5664	-5304	-4230	-4693	4575	-3826	4704	4772	-5612	-4577	4751	13600%
•	-149	-500	233	43	-381	399	308	-626	210	-465	-720	275	394	45	95	359	117	369	-294	249	/(
	-8	-8139	-91B1	-894	-1115	-701	-1376	•													<u></u> -
ı																				<u> </u>	

38(G)	677	-2128	-3838	4171	4641	3536	-3816	-4508	4340	-4749	-3867	-3009	-3149	-3871	-4137	-1784	-2005	-3297	-4725	4735	13700%
<u> </u>	·149	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	106 -1378 '	-628	210	-468	-720	275	394	45)	98	359	117	-369	-294	-249	
<u> </u>	-01	-0100]	-3101	-024]	1110	-/91	-1919							<u></u>	<del> </del>						
39(H)	-2667	-3375	-2882	-2114	-3744	-3201	4738	-3782	-445	-3553	-2886	-2112	866	-1265	1506	-2514	-2557	-3469	-3282	-2908	13800 K
<u> </u>	-149	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	105 -137B)*	-626	210	-468	-720	275	394	45	95	359	117	-369	-294	-249	
		- 0100]	-31011	<u> </u>		-701	-10101	1													<del></del>
40(A)	3631	-2768	-4492	-4815	4688	-2992	-4271	4761	-4816	-5025	4365	-3727	-3728	-4477	4545	-2567	-2762	-3952	4724	4942	11900%
	-149 -8	-500 -8139	233 -9181	-834	-381 -1115	399 -701	106 -1376*	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	358	117)	-369	•234	-249	
		V144		Vari	1119																
41(H)	-3103	-3464	-2%0	-2573	-783	·3679	4549	-3487	-1372	-3071	-2715	-2454	-3764	2546	-1428	-2990	-2976	-3308	2269	-2%	14000%
-	-149	-500 -8139	233 -9181	894	-381 -1115	399 -701	106 -1378	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
		<u> </u>		<u></u>	1114		1010														<del></del>
42(A)	3057	-1795	-4134	4277	-4057	-2118	-3548	-3549	4035	-4024	-3192	-2817	-2900	-3508	-3B23	217	-1660	-276	-4363	4211	14100%
<u></u>	-149	-500 -8139	233 -9181	-834	-381 -1115	- 399 -701	106 -1378	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
		· · · · ·																			
	.,[06]		-2044	1475	::/1216	2172	5 d154	: ig 789	ાં -1218	4061رنين			2346	2895	::141	ii. 1392	1005	693	.:1678	1278	14100%
737.9	449	28176	9181	(4) R94	3331	211.701	2001 WW.	7.00	210	3000 4 M	*********		7.77	(1) (2) (3) (4) (4) (4) (4) (4) (4) (4) (4) (4) (4	773 <b>70</b> 1	44.43 <b>4</b> 3	112 W 3	5 - 368 <sub>1</sub>	( 21	31-245	
					**************************************		11, 110, 111	- consid	3455.00	Samuell.	A117916	liniaie)¥iùi			. 13-,13, 214	-	2.250.2	1. <del>7 (11.</del>			WMIN
44(N)	-149	-4117 -500	-3389	-3749	-5073	·3911	4123	-6022	4503	-5797	-5419	4397	-4479	-4255	-4592	-4115	4312	-5371	-4350	4731	14300%
	-143	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	. 106 -1376°	-626	210	-456	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-284	-249	
	<sup>1</sup>	0.00																			
45(L)	-4414	-3800	-5638	-5528	-2290	-4980	-4628	-1886	-5423	3316	-1236	-5514	-4997	·4750	-5002	-5379	4399	-2629	-3665	·3690	14400%
<del>                                     </del>	-149 -8	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	106	-626	-210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-234	-249	
46(R)	-1731	-3015	275	-931	-3487	-2518	-973	-3116	2321	-2955	•2123	224	-2603	256	2808	-1596	-1613	-2730	-2995	-2515	14500%
<del></del>	-149	-500 -8139	233 -9161	-894	-381 -1115	399 -701	105 -1376	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
									L											- :	
47(D)	-2896 -149	-4843 -500	3855 233	944	-5037 -381	-2800 399	-2082 106	-5082 -€26	-2528 210	-4903 -466	-4373 -720	-1209	-3196 394	-1786	-3536	-2501 359	-3007	4517	-5004	-3956	14500%
<del>-  </del>	-192	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	-£20	210	-400	-120	275	304	45	96	228	117	-369	-294	-249	
48(S)	-1538 -148	-2212 -500	-2363 232	-2679 44	-4293 -381	-2279 398	-3082 105	-4365 -627	-3331 211	-4524 -465	-3676 -721	268 275	-3026 393	-2967 45	3497	3508 360	-1962 118	-3259 -370	-4477 -295	-4066 -250	14700%
<u> </u>	-155	-3318	-9181	-2405	-302	-701	-1378	•021	Z11	*100)	-121	219	939	40]	\$5	300	110	-310	-/30	-200	
49(G)	-2521 -149	-3968 -500	1232	-911 43	4849 -381	3373 399	-2126 106	-4854 -626	-2535 210	-4752 -466	4136 -720	-63 276	-31 <b>15</b>	-1836 45	-3440 96	-2284 359	-2716 117	-369	4880 -294	-3914 -249	15490%
<del>[                                    </del>	-143	-8133	-9191	-894	-1115	-701	-13781	-020		-400	-124	210	924	40[	20[	303	104	-303	-24	-240	
150(V)	-2767 -148	-2324 -500	·5232 233	-4770 43	396 -381	-4827 399	-3784 106	-36 -626	4546 211	848 -466	-611 -720	-4412 275	4518 394	-3980 45	-4367 96	-4081 359	-2716 117	-369	-3637 -294	-2660 -249	15500%
<del>[ </del>	-148	-3381	-91B1	-203	-2926	-701	-1378	-020	210	-900	-124	210	424	40]	20]	- NA	111	-003	-234	.743	
51(D)	-1684	-3285 -500	2735	2014	-3554 -381	-2196 399	-1177	-3350 -628	92	-3279 -466	-2427	692	-2505	-770 AE	-1595	·1483	-1666	332	-3450	-2676	15700%
<del></del>	-149 -8	-8139	233 -9181	-894	-1115	-701	-1378°	-020	210	400	-720	275	394	45	98	203	117	-369	-294	-249	
52(V)	3127	-2888	-5092	-5160	-3522	-4180	-4687	-905	-5060	-2626	-2570	-4662	-4579 204	-4940	-4923	·4013	-3297	3796	4414	-1190	15800%
ــــا	-149	-500	233	43	-381	399	106	626	210	-466	-720	276	394	45	96	359	117)	-369	-294	-249	

<u> </u>	-8	-8133	-9181	-894	-1115	-701	-1378		1							<u>.</u>					
53(V)	369	366	-3075	-2462	-883	-2557	-1420	1415	378	-757	-117	-2098	-2610	-1809	-2037	-1630	1166	2145	-1385	-343	15900%
	-149	-500	_233	43	-381	399	105	-626	210	-166	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	-249	<del></del>
<u> </u>	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378				<del></del>							·····			
54(V)	-2624 -149	-2122 -500	-5302 233	-4991 43	-2772 -381	-5108 339	-5139 106	2523 -626	-4948 210	-1533 -465	-1475 -720	-4791 275	4871 394	-4894 45	-5106 96	-4488 359	-2620 117	3088 -369	-4511 -294	-3996 -249	16000%
-	-143	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	-020	1	-1691	-160	213	***1					-404	·201]		
55(G)	929	-2107	-3852	-4182	4633	3492	-3809	-4486	-4335	-4732	-3635]	-2997	-3132	-3863	-4127	-1761	-1982	-3275	4720	472	16100%
-	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210		-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	<u> </u>	•										-		<del></del>
56(L)	-3427	-2938	-5791	-5325	-1449	5374	-4410	-543	-5063	3041	-25	-5207	4820	-4126	4691	-4757	-3351	883	-3184	-3234	16200%
	•149 •8	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	-137B	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
27.0V-60	istimudi:	bil rand	2017000		272.284N	de Mad		5X1540H3	- Asia din k	2 3 /2 3c 6b / 3	Stherido	Jiseni.	Septial:	Steriorals	) Honnii	el Chenil )	i))]]]]]]]]]]]]]	t:Ezepal:	:281a13	101 <b>102 1</b> 42	:: \$15 keonne/
455.050	340 349 349	500	233	7/(c.43	77,381	11771399	2001018	5: C : 575	210	7.24400	111.720	*1: 275 u	271.304	Y 127745	795	H444250 1	101:117	477 369	1977294	(4.74	Carriery Carriery
Person dist		8 (39)	-Ka9181	::::834			in =1378]	4400	10[003+003 10[003+003	, 2009 E 15275	an language	ATT WELLT	acachiner	e - 5399334	7-10-11 H	#183194	FAIR AN	erenter describer	e4-25-3536	\$4 30 player \$ \$65	angerena.
58(K)	31	-2412	-803	1532	-2743	-1920	-559	-2483	1772	-2421	1600	-556	1229	727	1079	-566	-893	-2041	-2579	-1915	16400%
	149 -8	-8139	-9181	-834	-381 -1115	399 -701	106 -1378	-626	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-359	-294	-249	
ròm	9074							1000	4000		- IAIH	444	444	4000			4944	(8.48)	1250	Ancel	
59(G) -	-2671 -149	-4661 -500	1614 233	587 43	-4832 -381	3103 399	-1901 106	-4803 -626	-2269 210	-4648 -466	4047 -720	421	3049 394	-1597 45	-3230 96	-2297 359	-2766 117	-4245 -369	4850 -294	-3752 -249	16500%
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378		•												·
60(S);;%(		2308	~-1932		4000	:: 1604	212	- 13/SI	1362	370	2015	::: 83 <b>3</b> 2	2627	(217X)	1902	£2130		2970	3910	3479	15500%
1,000	144 ±149	37 (500) 38 (100)	200	343	381	\$(1)\$ <b>199</b>	15 : 108	19 9 <b>.62</b> 8	210	716	720	275	394 t	14 : 15	95	19359	361	crc=369 c	c -294	35,249	
		Control II	171-75-74-0	**********	76777-71	12-12-12-1-12-1	15-7-1-5-1		e e e e e e e e e e e e e e e e e e e	-											
61(K)	1362	-2232 -500	-619 233	-98 43	-2567 -381	-427 399	435 106	-2309 -626	1599 210	-2265 -466	·1349	1101 275	-1861 394	836 45	-512 96	833 353	740	-1868 -369	-2441 -294	-1767 -249	16700%
	-9	-79 <b>0</b> C	-8943	-B94	-1115	-344	·2238														
62(S):		::::190 <b>4</b> :	3742		:::4384	2:2155	#5 <b>/J593</b>	4209	::.::399E		- - 1373	2789	2848	3606	JB32 2	3517	228	:3128 S	₩4 <b>00</b> 0	4451	H-:45800%
1777	E1974911	500	12 231	1,000	238	(1) 399	2106	11,1626	2453210	7757.466	\$ 120	111276	194	FE 140 A	27746 ?	359	(#31) t	369	@2 <b>29</b> 1	2.9	CTPREE
2011 ERE	waneon.	15 <b>401</b> 901 1	322710112	**************************************	RWIII)	aran da	160 010	er milital	army.									<b>特殊計畫</b>	A.K.A.B.L.	Privariteite	Minspins
<b>5</b> 1(V) 4 5	136 126 i 149 F			11 7 m.F			A. C. S.	60	2257	3701				(698				390	4091	918	1690174
1927 1930 1927 1930 1939 1933	22.28	-8 39	#K9181	1 1834	1115	**************************************	1378		100 A 10	1772; Madila	entings Strings	50 (8) (4) 50 (8) (4) 54 (8) (8)	ना स्टब्स्ट	Section Sectio	37-28-04 87-28-04 21-28-05		HE GOVE	ACCOUNT OF	entranti entranti entranti	55.32 71.42 55.32 71.42 55.32 55.53	
64(E)	1527	2104	212	1636	-2722	-1878)	-568	-2474	1241	-2419]	-1497	350	-1985	-100	-659]	98	70	-2025	-2589	1903	17000%
-	-149	-600	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	391	45	95	359	117	-369	-234	249	
-	8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	i								-					
65(K)	-6	-2242	-895	770	·2502	-1963	-609	-2192	2589	22	-1353	-631 275	-2052 394	692	-617	-889	-906	-361	-2456	-1836	17100%
	-149 -8	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	105	-626 '	210	466	-720	410	024	45	96{	359	117	-369	-294	-249	
66(A)	3631	-2768	-44 92	-4815	-4888	-2992	4271	-4781	4818	-5025	4365	-3727	-3728	4477	-4545	-2567	-2762	-3852	-4724	-4942	17200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	108	626	210	-3025 -466	•720	215	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	112007
	-8	-8139	-9181	894	-1115	-701	-137B*														

c7/Di 1	-1006	-2441	-869	1767	-2780	-1965	-586	-251Q	1702	-2445	-1534	-603	-2052	1923	873	-88B	236	-630	-2596	-1949	17300%
67(Q) -	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
68(A)	1489	-2393	167	1234	-2711	-1873	-547	-2452	895	-2408	-1485	1181	-1977	-90	-64B	666	141	-2014	-2577	-1892	17400%
-	-149	·500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-91B1	-694	4115	-701	-137B*	,													<del></del>
20(T)\	2104	-2898	2124	985	3163	-2036	1397	-2935	-693	-2897	-2025	-723	-2329	-543	·1250	-1245	-1368	-2501	-3087	-530	17500%
69(D)	·149	-500	233	43	-381	399	196	-626	210	-466	-720	275	394	45	.96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	·1378 <sup>1</sup>			<del></del>											. —
20/03	-2234	-2898	-2521	-2885	4852	3641	-3456	-5042	-3796	-5094	4356	365	-3545	-3376	-4005	-2451	-2700	-3996	-4706	-4575	17600%
70(G)	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	894	-1115	-701	-1376														
7400	G-25 name (		4686	4400	62400 S	<u> </u>	H 1010	izinz <b>kos</b> l.	(CEASES)	3453 <b>/ AGCE</b> 133	Sec (405) à	(13595 A	×3961/4	93157 <i>(</i> 2)	-3574	·-3277 +	2609	÷4337	1621	·	477814
	2596 		233	7 100	381	399	100	626	210	466	120	275	36334	15	96	359	107	169	24	249	7897784CH4176
200	14.130	8139	-9181	·B34		701	378		***	<b>74448</b>		Highil		g Princip			High		Kirks.	9134	KINEDI
					apre)	-1854	-512	-507	1721	-2364	-1439	490	-1947	672	436	806	687	1970	-2533	-1851	17800%
72(K)	-149	-2348 -500	338 232	950 46	-2668 -381	399	105	-627	210	-466	-721	217	393	45	95	359	119	-370	-295	-250	
-	-155	-3318	-9181	-2159	-356	-701	-1378														
					1020	9147	-2822	28	3369	320	-897	-3230	112	-3099	-3291	-2619	-767	3269	-2708	-2354	18400%
73(V)	-1810 -149	-1639 -500	-4149 233	-3689 43	-1869 -381	-3417 399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	السند
	-143	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378												:		
					201	407	1407	200	ALIE	S15	1186	-1534	-2401	-1174	-1547	-764	-172	-526	-1519	1413	18500%
74(K)	847 -149	-1093 -500	-2131 233	-1554 43	-381	127 399	-1127 106	-637 -626	1445 210	645 -466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	100070
-	-143	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378		1		:-1										<del></del>
									27A		4044	cool	0040	(07)	-1095	1451	1827	-2411	-2986	-2264	18600%
75(T)	-1284 -149	-2794 -500	1526 233	1290 43	-3096 -381	-2041 399	1289 106	-2863 -626	-548 210	-2908 -466	-1914 -720	-668 275	-2242 394	-427 45	96	369	117	-369	-294	-249	. 10000 /6
-	-143	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	- 520	• •	1739											<u></u>
	<u> </u>									waal		4.6	eorl	ennal	7444	-1695	945	2346	-1458	-1106	18700%
75(V)	-1089 -149	-957 -500	-3143 233	-2535 43	-943 -381	-261B 399	-1498 106	1052 -626	-2198 210	-792 -466	1858 -720	-146 275	686 394	-1884 45	2111 96	359	117	-369	-294	-249	101 00 10
	-143	-8139	-9181	-891	-1115	-701	-1378	720	•												.1
	1								,		440	Esal	700	49	104	44	and	-1936	2212	-1843	18800%
77(N)	1606	-2321	-752 233	612 43	-2628 -381	-323 399	-527 106	-2366 -626	1480 210	-2331 -466	-1416 -720	-510 275	-789 394	-73 45	421 96	23 359	-829 117	-369	-294	-249	10000 72
	-149	-500 -8139	-9181	-894	-1115	-701	·1378	-920	. 210	יייי יייי	120[										
	<u> </u>										,,,,,,,	2221	Actal	4000	AMA	LAAL	PEC	2401	2700	_2057	100000
78(E)	-1509	-3540	1372	3127	-3861	-120	·1391	-3685 -626	-1319 210	-3605 -466	-2787 -720	-900 275	-2659 394	-1005 45	-1976 96	-400 359	-655 117	-3194 -369	-3790 -294	-2957 -249	18900%
_	-149	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	-1378	-020	1 210	-400	-1201	tin	034	70		844	<u> </u>	- 004			
	1	4104	*(*4)											- 44421	Aniel	(FAT	204)	0001	4500	#/ml	1000001
79(A)	3390	-1868	-4092	-4341	4332	-2153	-3680	-3942			-3471 -720	-2869 275	-2948 394	-3730 45	-3919 96	·1525	931	-2894 -369	-4580 -294	-4483 -249	19000%
<u> </u>	-149 -8	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	-701	106 -1378	-626	210	. •405	-120	210	374	40	avi		[11]	- 443		•14	
-	1 -01	-0103	-3101	-034	-1110	701	. 10/0		L									- ;т			inana.
80(V)	2003	-1721	-4449	-3995	-2160	-3763	-3240	1342			-1124	-3561	-3855	-3494	-3700	-2979	-58 117	2574 -369	-3091 -294	-2698 -249	19100%
-	-149	-500	233	43	-381	399 -701	106 -1378	-626	210	-468	-720	276	394	45	96	359	117	-000	234	*/*\	•
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-101	-1318		L	L											
81(K)	1714	-2501	-959	446	2858	2043	-654	-2574			-1609	-689	-2135	-203	1088	428	-1032	•2148	-2652	-2027	19200%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	-249	

	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-137B														
82(W)	265	-2347	815	432	-2663	634	-519	-2410	619	-2361)	-1438	496	-1952	1955	-603	-382	147	-1956	2853	-1853	19300%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210		-720	275	394	45	95	359	117	-369	-284	-249	
	-8	-8139	-9181	-B34	-1115	-701	-1378														<u> </u>
IONAL T	2204	. corol	2100	1070	41145	- 0100	2041	4207	4197	4150	-3565	-2837	-2929	-3729	-3959	701	-1718	-3001	486	-4534]	19100%
83(A)	-149	-1860 -500	-3338 233	-4279 43	-4411 -381	-2128 339	-3684 106	-4207 -526	210	-4490 -486	-720	275	394	45	\$6	705 359	117	-369	-224	-249	191707
ļ —	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-137B*					<u>=.v,</u>							مانت.		
					40.40		Janal		450/	(72.0)	4484	(Anel	anad	· · · · · ·	Anen	Ases	ANIA	25.29		1000	4024084
84(D)	-2747 -149	-4795 -500	3813 233	395 43	-4912 -381	-2498 399	-1935 106	-4305 -628	-2324 210	-4735 -466	-4166 -720	-1079 275	-3082 394	€03 45	-3256 96	·2353	-2844 117	-4347 -369	-4929 -294	-3809 -249	19500%
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	- 1	•		124										
															10.4					2000	(00)
85(V)	-2717 -149	-2220 -500	-5338 233	-4951 43	-2254 -381	-5099 . 399	1670	1963 -526	-4844 210	1563 -466	-1011 -720	-4759 275	4771 394	4509 45	·4836	-4427 359	-2588 117	2741 -369	3899 -294	-3628 -249	19600%
	-8	-8139	-9(8)	-894	-1115	-701	-1376	-920	1	70	-124	214	344	47	- 44	- 303	1111	VW]	-221	-210	
					77.1																
86(V)	2635	-2129	-5306	-4970	-2652	-5125	-5011	2554	4915 210		·1368	-4781	4852	4798	-5938 96	4487	•2622	3019	4355	-3902	19700%
<del></del>	-149	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	106 -1376	-626	210	-466	-720	275	394	45	30]	359	117	-369	-234	-249	
		. 4144	4141																		
97(M)	-1340	-1208	-3317	-2708	-988	-2860	-1708	577	-2346		4131	-2382	-2878	250	-2265	-228	-1278	-606	-1629	-1313	· 19300%
	-149 -8	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	106 -137B*	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	•
		-0195	-5101	-024	-1110	*(0)[	*1370			<del></del>		<del></del>				_		<u>_</u>			
88(1)	-2566	-2177	-5017	-4470	669	·4496	-3487	2791	4191	1116	1394	4156	4228	-3615	-3972	-3687	-2499	1692	-2860	-2711	19900%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	369	-294	-249	
-	-8	8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378							<del></del>			<del></del>				<del></del>
89(L)	-4414	-3800	-5638	-5628	-2290	4980	+1628	-1385	-5423	3316	-1236	-5514	-4997	4750	-5002	-5379	-4399	-2629	-3665	-3690	20000%
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-525	210	-466	-720	275	394	45	58	359	117	-369	-294	-249	
	-8]	-8139	-9181	-894	-1115	-701	·1378	L											<del></del>		
900)::::	1212	1286	3845	3262	: R60	3195	1166	1618	77.2918	1031	%!! <b>493</b>	-1824	3211	×2583	S-2702	2308	1598	1299	2020	1668	20100%
37 33 13 4 2373175217		2.300	233	43		12 399	10st		210	3)E-26	2E.20	275	194	15	56	.2339.5	117.		13:29	249	22.000 4.20.000
\$2.44.55		19139	449181	5177 <b>1334</b> 17	2415	ta (0)	# 1378	finds laid	W. W.		THE STATE	billini	eit-iletele Kontono	i gright	Kirilii H	insidi	XIIII 48	ફેરાંશ્વર્યોલા	indian'i	naide.	संस्थितानील
91(P)	-1614	-2214	-3396	-3710	-4516	-2407	3518	-4516	-3976	-4705	-3849	-2890	3993	-3625	-3900	666	-2068	-3354	4610	-4474	202007/
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	276	194	45	\$6	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378		<u>'</u>	<del></del>			_	¥							
92(D)	<b>4580</b>	-4701	4174	-3014	-5700	-3967	-3905	-6376	4478	-6024	-5744	-3355	-4501	-3870	-4926	4440	-4750	-5894	4922	-5231	20300%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	294	-249	
	-8	-8139	-91B1	-894	-1115	-701	-1378														
93(E)	-1123	-2199	-937	2715	-2589	·2046	-912	-2250	-625	-2356	1979	-870	-2250	-554	-1093	463	932	-1902	-2660	-2064	20400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-834	-1115	-701	-1376														
garlen 1	399	-1137	-2012	-14	1582	-2306	1600	246	-1252	190	-326	-1458	2374	1,17,1	- Mapl	ادور	-905	gaci	-1657	-1158	20500%
94(H)	-149	-1137	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	1474 45	-1479 95	359	117	-369	-1007	-1106	200007
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376	<u> </u>			7.71.							. :::1_			
07.00	6714	94.40	ATAIT	aras!	0704	23.231	المدنم	4041	(884)	Med	Over	APAAI	A944	1015	1000	0004	AATT	ecel	Accel	A7/4l	Assaul
95(O)	-2742 -149	-3142 -500	-2766 233	-2681 43	-2790 -381	-3344 399	-2460 108	-160 -626	-1802 210	-2456 -466	-2353 -720	-2682 275	-3710 394	4317 45	-1866 95	-2894 359	-2844 117	-2559 -369	-3295 -294	-2711 -249	20600%
-	-8	-8139	-91BI	-894	-1115	-701	-1376	-020		-+00	-120]	-14	494	40]	901	- wa	सम	-500	-227]		

96(A)	1981	-2315	-809	-268	-2645	-531	-579	-2374	232	-2350	-1445	-567	1217	711	445	447	-874	-1951	-2540	-1883	20700%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	!													
97(D)	491	-2351	1394	1381	-2671	-1854	1062	-2421	1010	-2367	-1440	-489	-1947	1017	362	-760	250	-623	-2635	-1852	20800%
E	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-284	-249	-
<u> </u>	-8	-B139	-9161	-894	-1115	-701	-1378				:_	<del></del>									
98(V)	-2039	-1706	-4456	-3939	-1846	-3939	-3049	1986	-3656	1460	-826	804	-3870	-3351	-3565	-3105	-2000	2330	-2796	-2442	20900%
	-149	•500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	249	
<u> </u>	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376	!													
99(Y)	-4840	-3766	-5230	·5581	1898	-5109	-1300	-3727	-5135	-3041	-3132	-3723	4964	-3861	-4501	-4357	-4690	-3883	3325	4377	21000%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-486	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9161	-894	-1115	-701	-1376										<u> </u>				
100(E)	·163	-2353	-734	1681	-2674	-1859	888	-2422	1668	-792	1443	777	-1952	890	286	-766	238	1975	-2536	-1856	21100%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
<u> </u>	-257	-8139	-2649	-894	-1115	·701	-1378														
101(E)	1017	-2763	862	2042	-3060	-1913	-775	-2836	-495	-2773	-1886	1956	-2143	-136	-1056	266	-1185	-2377	-2948	-2207	21200%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-284	-249	
-	-9	-7891	-8933	-894	-1115	-338	-2261		<u> </u>												<del></del>
102(E)	914	-2422	663	2138	-2740	-436	-567	-2493	894	-2437	-1515	-518	-1994	1767	-673	109	-865	-1023	-2605	-1917	21300%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	-
	-8	-8139	-9161	-894	-1115	-701	-1378 '	'								· · ·					<del></del>
103(f)	-2660	-2156	-5316	-4965	-2520	-5119	-4900	3165	4894	297	-1251	4175	4828	-4705	-4975	-4476	-2642	2240	4202	-3814	21400%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-137B*	Ľ									···			<del></del>	
104(E)	1058	-2341	-766	2003	628	<b>-18</b> 87	876	-2380	1240	-2341	-1436	-529 275	-1983	881	-618	-804	-855	-1954	-2530	-1862	21500%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	369	-294	-249	
<u> </u>	-6	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376						:	-							<del></del>
105(P)	343	-3144	1561	442	-3538	-489	-1216	-3329	-1038	-3274	-2420	848	2974	-812	-1635	469	-1644	-2849	-3462	-2693	21500%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-284	-249	
<u> </u>	-6	-8139	•91B1	-894	-1115	-701	-1378				·							<del></del>			<del></del>
106(N)	-1173	-2375	-814	827	-2376	-2071	1767	-2273	-479	-2336	·1503	3151	-2218	-415	-957	-1093	-1120	-198	-2486	647	21700%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	248	
┝─┤	<u>-</u> tq	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														<del></del>
107(M)	3415	-2890	-5826	-5252	-1352	-5486	-1282	1361	-5022	2621	2728	-5181	-4778	-4005	-4613	4776	-3292	69	-3071	-3194	21800%
	-145	500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	249	
$\vdash$	-8	-8139	9181	-894	-1115	701	-1378									<del></del>					<del></del>
108(K)	-1941	-3098	-1997	-1232	-3650	-2740	-1025	-3210	3059	-3010	-2208	499	-2766	1457	1261	-1817	-90	-2858	-3002	-2622	21906%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
<b>  </b>	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378													<u> </u>	
109(P)	1129	-2426	-740	964	-2747	1313	-589	-2491	1139	-2440	-1525	-552	1941	1446	-655	-480	-913	-2050	-2610	-1935	22000%
	-149	-500	233	43	-361	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-234	-249	
لـــــا	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	'										<u>.</u>			
110(G)	-2276	-2907	-2347	-2709	-4832	3554	-3349	-5005	-3678	-5053	-4315	1193	-3507	-3243	-3937	-2418	-2674	-3974	-4703	4521	22100%
	-149	500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-389	-294	-249	
_											-						-			-	

	-8	-8139	-9181	-834	-1115	-701	·1378 '					····									
111(A)	1730	-2349	958	-198	-2661	-1858	-535	-2405	927)	-2362	-144)	414	-1968	786	- <b>630</b>	798	-840	-303	-2540	-1863	22200%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	انتيسسي
	-8	-8139	-91B1	-894	-1115	-701	1378														
112(1)	1350	-1149	-14	-1461	-1155	-2314	-1111	758	-1275	-1024	1167	-1475	-2388	-1111	-1501	334	1843	354	-1581	-1182	22300%
. 1120	-149	-500	233	43	-381	399	106	-628	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	beat viti
	-8	-8139	-9181	-694	-1115	-701	-1378														
1104	4400	4702	cosal	roay	4100	cesel	1200	1004	ciast	2018	- Anal	cord	1027	4476	imal	1001	2026	2021	1001	-3351	22400%
113(L)	-3333 -149	-2796 -500	-5806 233	-5293 43	-1506 -361	-5535 399	-4502 (06	1096 -626	-5103 210	2935 -466	-282 -720	-5232 275	4857 394	-4172 45	4762 98	-4864 359	-3236 117	506 -369	-3264 -294	-249	LETVUTC
	- 8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	***	<del>' ''</del>												
																2221		144.00	40.40	4.03	100111
114(A)	1769	-1525	158 233	-857 43	-1603 -381	148 399	-891 106	-1181 -626	•752 210	187 -466	-712 -720	1040 275	-2228 394	660 45	·1135	359	-913 117	1305 -369	-1913 -294	-1442 -249	22500%
$\vdash$	-149 -8	-500 -8139	-9191	-894	-1115	701	-1378	-920	210	-400	-1201	214	334	40	70)	000]	114	1000	1607	-279	
<u> </u>	<u>`</u>	- 01001	<u> </u>	<u></u>									·								
115(F)	4110	-3437	-5436	-5431	4216	-5143	-2159	-1742	-5074	553	-1124	-4290	-4871	-3987	·4561	·4547	-4016	-2374	-1356	-292 -249	22600%
	-1 <b>4</b> 9	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	106 -1378	-626	210	-466	-720	.275	394	45	98	359	117	-369	-294	-249	•
	-0	-0133	-3101	-034	чиы	-101	-1010									<del></del> -					<del></del>
116(A)	3091	-1829	-3998	-4219	4413	119	-3537	-4216	4134	-4469	3523	-2798	-2896	-3656	-3927	1514	-1679	-2983	-4632	-4539	22700%
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-243	
	8	-8139	-9181	-834	-1115	-701	-1378*	1													<del></del>
117(H)	-5197	-4539	-4720	-5009	4036	-4506	5435	-6314	4911	-5786	5667	-4954	-4960	-5011	-4732	-5391	-5395	-6022	-4063	-3641	22800%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-834	-1115	-701	-1378														
118(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6627	·5765	-6297	-5970	-5141	-4304	-5546	-5385	4727	-4815	-5862	4924	-5849	22900%
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-826	210	456	-720	275	394	45	95	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-137B°									<u>.</u>		<del> </del>			•
119(F)	4044	-3337	-5534	-5444	4093	-5246	-2370	-1514	-5107	1089	-868	-4443	-4880	-3998	-4592	-4633	-3934	-2200)	-1536	-523	23000%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-91B1	-894	-1115	-701	·1378*		'							<u> </u>					
120(N)	885	-1899	-2020	-1781	-2956	-2135	·1925	-2602	•1809	3	-2052	3468	-2633	-1676	-2141	413	·1437	-2139	-3194	-2737	23100%
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-456	-720	276	394	46	96	359	117	369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	·13781														
1010	8070	Aire	Panil	1000	A 2 3 3	2400	1676	2000	1000	250	4044	ATON	4004	-4681	-4961	-4472	-2653	1969	-4158	3791	23200%
121(1)	-2673 -149	-2169 -500	-5324 233	-4969 43	-2477 -381	-5123 399	-4876 106	3293 -626	-4893 210	358 -466	-1211 -720	-4780 275	-4824 394	45	96	359	117	-369	-294	-249	2020074
$\vdash$	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378		,		<u>;=-</u> L			:							
																4444	4794	(10.04)	(478)	ATEOL	0402500
122(H)	-3381 -149	-3705 -500	-3197 233	-3491 43	-4166 -381	638 399	5216 106	-5496 -626	- 3798 210	-5304 -466	-4811 -720	-3481 275	4165	-3770 45	-3879 96	-3508 359	-3702 117	-4793 -369	-4170 -294	-3759 -249	23300%
-	-149	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	-020	- 210	1409	-120	- 614	wq	44	70	930	iiq	-000	wij	***	
	<u></u>			****				<u>-</u> -													
123(Y)	-4816	-3757	-5210	-5549	3410	-5097	2153	-3719	·5105	-3041	-3127	-3715	4955	-3851	-4483	4344	-4669	-3970	547	3577	23400%
<u> </u>	-149	-500 -8139	233 -9181	43 -894	-389 -1115	399 -701	105 -1378*	-626	210	-468	-720	275	394	45	96	359	117	-169	-234	-249	
<del>                                     </del>	-8	-0133	-2101	-071	-1184	-101	-1010														
124(G)	-1055	-2519	948	-272	-2320	1844	998	-2566	972	-284	-1522	1553	-2090	-229	-802	-938	-1011	-2133	-2708	-2021	23500%
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	720	275	394	45	96	359	117	-369	-234	-249	
لــــز	-8	-8139	-9181	-834	-1115	-701	·1378		1											·	
L															<del></del>						

								35 - 1589	15.586	1526	E (121)	182187	(13 <b>13</b> )	3585	2478	°F2137	1564		2189	3*2414	73EDDY
*131(19)	444444 44444	(201-590 ₹₹¦\$ <b>8</b> 139	233 ****9j61	37. 344 394			161 31378	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	210	5, (e46) 142(8)	:::124 :::::::::::::::::::::::::::::::::	in i <b>H</b> b.	394 <sub>7</sub> 515651	45]. 	444)96 1475)14	44 200 44 200	uindi):	221-2 <b>383</b> 22-22-22-2	73 - 234 123 - 1234	(16:4-249) (16:4-249)	
126(1)	149	-1916 -500	-4813 233	-4433 43	-2456 -381	-4221 399	-3937 108	3248 -628	4248	-1515 -466	-1324 -720	4044	-4259 394	-4063 45	4255 96	230 359	-2280 117	2003 -369	-3673 -294	-3237 -249	23700%
	-8	-8139	-9131	-894	-1115	-701	·1378														
127(19)	-886	-2231	334	1172	-2504	-1881	-546	-93	1370	-300	-1337	465	-1974	655	-646	-794]	-921	1255	-2449]	-1798	23800%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
<del></del>	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	نــــــــــــــــــــــــــــــــــــــ	<u>'</u>			<del></del>	<u>`</u>								
128(P)	715	-1925	-3618	-3397	-4464	653	-3594	-1274	4053	-4520	-3596	-2770	3775	-3593	3911	-1550	-1770	-3067	-4647	4548	23000%
<u>:</u>	-149 -8	-500 -8139	223 -9181	43 -894	-381 -1115	399 -701	108 -1378	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
				<del></del>																	
128(P)	479 -149	-2398 -500	1173 233	-637 43	-2915 -381	-2106 399	-848 106	-2610 -626	-289 210	-2586 -466	-1713 -720	-884 275	2238 394	1247 45	2195	359	-1147 117	-2184 -369	-2757 -294	-2174 -249	24008%
	-6	-81 33	-9181	-894	-1115	-701	-1376	3	1 10	-400	-720]		324	40	301	1600		-509	*234		
130(A)	1787	-2663	1377	529	-2976	-1992	-762	-2736	1785	-2680	-1776	-523	-2161	-319	-536	297	-1120	-2285	2052	2110	2/1009/
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-2263	-2853 -294	-2146 -249	24100%
	-2336	-8139	-25	-894	-1115	-701	-1378		<u>'</u>	<del></del> .	<u> </u>										
131(F)	-1308	-1104	2227	-2120	3516	-2093	-244	-196	-1891	64	66	-1626	-2278	-1503	1793	-1617	-1350	-389	305	1335	24200%
-	-149 -38	-500 -5840	233 -6882	43 -894	-381 -1115	399 -3098	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-36	-364V)	-0002	-589]	-1115	-3098	-179	<u></u>							<u> </u>		,				<u> </u>
132(P)	-603 -149	-937 -500	.97	-1058	-1632	-1041	-1092	-1737	-1074	-1874	-1416	-992	3539	-1065	-1192	-789	-866	-1383	-1765	-1661	24300%
	-38	-5840	233 -6682	-894	-381 -1115	399 3038	106 -179	-626	210	-466	-720	215	394	45	98	359	117	-369	-294	-249	
122.60	904	4169	821		4000	. (335)		4000		4000	1001	- 4 (0)				****					
133(K)	-804 -149	-1483 -500	233	-230 43	-1920 -381	-1335 399	-101 106	-1605 -626	2889 210	-1630 -466	-1021 -720	-349 275	-1569 394	232 45	633 96	-786 359	759	-1358 -369	-1637 -294	-1317 -249	24400%
	38	-5840	6682	894	-1115	-109	-3775														·.',
134(D)	-2405	-4159	3349	-651	4260	-261	-1744	4307	1947	-4207	-3514	2151	-2936	-1416	-2754	-2102	-2471	-3802	4324	637	24500%
	-149	-500	231	43	-3B1	399	106	-628	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-243	- 1.00 K
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378		1			·									<del></del>
(35(1)	-2047	-1713	-4504	-3983	-1821	-3943	-3061	2461	-3697	1581	-797	-3593	-3873	-3371	-3587	-342	-2009	1904	-2784	-2441	24600%
	-149 -8	-500 -€139	233 -9181	43 -694	-381 -1115	339 -701	106 -1378	-626	210	466	720	275	394	45	96	359	117	-369	294	-249	
																·				<del></del>	
36(D)	-2024 -149	-3444 -500	3496 233	-680 43	-3868 -381	-2331 399	-1598 106	- 44 -626	-1632 210	-3675 -466	•2915 -720	685 275	-2782 394	1248 45	-2305 96	476 359	-2088 117	-3196 -369	-3911 -294	-3098	24700%
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	·1378	- 920		-400/	-120	210	334	40	30]	200	<u> 1111</u>	-303	-24	-248	
37(V)	-3122	-2888	-5092	-5160	-3522	-4180	4007	1200	6000	201	557AL	400%	4570	4010	1000	4012	2507	4700	1444	4100	0.4000001
\$1(V)	-149	-500	233	43	-381	399	-4687 106	-905 -626	6060 210	-2626 -456	-2670 -720	-4662 275	4579 394	-4940 45	-4923 98	4013 359	-3297 117	3798 -369	-4414 -294	-4190 -249	24800%
	-8	-8139	-9161	-894	-1115	-701	-1378	·													·
38(1)	-53	-875	-3230	-2609	1867	-393	-1422	2613	-2236	-723	-81	-2157	-2608	-1885	-2086	·1633	276	-271	-1325	844	24900%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	56	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-834	-1115	-701	-1378	!'					·	<u> </u>							<del></del>
39(M) .	315	-2345	4154	-4279	-1396	4001	-3301	-697	-3877	816	4676	-3879	-3994	-3361	-3676	-3242	-2531	-1114	-2716	-2629	25000%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	369	-234	-249	

. 1	-81	-6139	-9181	-894	-1115	-701	-13761	- 1								_					
		0,007	3.5.	VI.,											2/00	Line	- A216	12000		2001	4(4)01/
140(1)	-2623	-2122	5301	4990	-2770	-5102	-5132	2415	4915	-1532 -466	-1474 -720	-4791 275	-4869 394	-4890 45	-5102 98	·4483	-2619 117)	3205 -369	4506 -294	-3991 -248	25100%
	-149	·500	233	43	-381	299 -701	106 -1378	-628	210	400	-120	2/0	334	451	- 301	w.s	- 11/1	-1001		270	
- 1	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-101	1010			<del></del>											
141(A)	3405	2528	-4529	4798	-4340	-2751	-3851	-3901	-4447	-4351	-3532	-3057	-3052	-3976	-1112	·1643	-1844	-2329	4572	4519	25200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-456	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-234	-249	
	-8]	-8139	-9161	-694	-1115	-701	-1378		1					_							
142(P)	-4853	-4392	-5213	-5573	-5853	-4408	-5077	-6679	-5780	-6281	-6067	-5357	4310	-5648	-5396	-5165	-5194	-6092	4900	-5786	25300%
142(F) -	-149	-500	233	43	-381	399	105	-525	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-13781	1													
			-					reed	0601	227.0	1707	-3921	JEAE	-3079	-2169	-4529	-4408	-5264	4403	4729	25400%
113(19)	-4484	-4357 500	-4390	-3992 43	-5413 -381	-4236 399	-3307 105	-5555 -626	3594 210	-5171 -466	-4707 -720	275	-4535 394	45	96	359	117	-369	-294	-249	42/1977
-	-149	-500 -8139	233 -9181	-894	-1115	-701	-1378	7020	214	100	-irvj										
		701007	-4191	wij	1119	, , , ,												`			
144(G)	2157	-1833	-3983	-4199	-4430	2715	·3642	-4235	4146	-4489	-3540	-2795	-2898	-3661	-3939	910	·1682	-2994	4647	<b>-4</b> 556	25500%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-369	-294	-249	
<u> </u>	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	!									·				<del></del>
145(P)	-2604	-2948	-4034	-4235	-3544	-3269	-3767	-3353	-3912	-3056	2095	-3659	4036	-3912	3822	-2883	-2963	-3249	4027	-3787	25000%
14:0(F)	-149	-500	233	43	-381	399	105	-625	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
-	-8	-8139	-9181	-B91	-1115	-701	-137E														
									- racel	-	- Fernal	2414	1001	FEAR	ranti	1707	1042		1001	-5849	25700%
146(G)	4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028 108	-6627 -626	-5765 210	-6297 -466	-5970 -720	-5141 275	-4804 394	-5546 45	-5385 96	-4727 359	-4815 117	-5862 -369	-4924 -294	-249	23100 10
$\vdash$	-149 -£	-500 -8139	-9181	-894	-381 -1115	399 -701	-1378	-020	210	***09	-1201	27.9	941	70]						<del></del> .	
<u> </u>	71	-0100]	-7101	-way	-itiv		10.01														
147(H)	-2569	-3440	-1867	-1702	-3820	-2996	4731	-3830	634	-3639	-2963	-1838	1551	-1305	-748	-2470	-2510	-3432	-3434	-2990	25800%
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-359	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-694	-1115	-701	·1376			<u>.</u>							· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		· · ·	<u> </u>	<del></del>
148(1)	194	-1498	-3256	-2899	-2240	-2226	-2291	-1764	-2652	1834	-1430	-2330	-2747	-2399	2684	567	2687	-1484	-2682	-2351	25900%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-234	-249	
•	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	·1378							•							<del></del>
11000		oonal	coool	EACOL	2620	1460/	16031	.005	-5060	2626	-2570	-4662	4579	-4940	4923	-4013	-3297	3796	4414	4190	28000%
149(V)	-3122 -149	-2888 -500	-5092 233	-5160 43	-3522 -381	-41E0 399	-4687 106	-905 -626	210	-466	-720	275	394	45	96	.359	117	-369	294	-249	
$\vdash$	-197	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376	720	- 1	1007											
$\vdash$																				المما	- Arianti
150(R)	-4845	-4446	-5107	-4682	-5507	-412	-3791	-5946	-2789		-5118	-4521	4754	-3672	4219 96	-4989 359	-4832 117	-5644 -369	-4538 -294	-4993 -249	26100%
·	-149	-500 Nac	233	43	-381	399	108	-628	210	-466	-720	275	394	45	30	333	. 111	-400	-204	-244	
<u></u>	-8	-8139	-9181	894	-1115	-701	-1378	1		L	<del></del>						<del></del>	<del></del>			
151(R)	-962	-2395	-777	1012	-2721	76	1031	-2459	-142		-1501	-580	-2018	-128	2308	1224	-66	-2023	-2585	1919	26200%
	-149	-600	233	43	-381	399	106	-626	210		-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378					_									
150/5	1	M75	mel	hree	9994	la cos.	-511	-1837	. 259	-221	-1156	520	-2024	816	-735	-658	1303	-287	-2295	537	26300%
152(E)	-902 -149	-2032 -500	-899 233	2078 43	-2228 -381	-1934 339	105	-1637	210		-720	275	394	45	95	359	117	-369	-294	-249	
<del></del>	-143	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	1	-		····										
	ــــــــــــــــــــــــــــــــــــــ														1841		LAGA	2000	2021	4054	OFALSET
153(Y)	-4920	-3765		-5565	3303	-5093	-1317	-3703			3111	-3732	4959	-3868	-4500	4356	-4679 117	-3867 -369	-565 -294	4052 -249	26400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	111	-903	*GH	-240)	
<u> </u>	-8	-8139	-9161	-894	-1115	-701	-1378			L						<del></del>					
L																					

154(V)	129	-1901	-939	821	-2060	-1969	-654	-1704	496	-52	-1037	-703	-2057	695	-796	443	-344	1871	-2192	-1626	26500%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	\$6	359	117	-389	-294	-249	2000076
•	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376		1								. ,				
ASS(P)		MEET	0.11		4070	4650	eiel		1000	- ianal											
155(0)	575 -149	-2355 -500	314 233	1158 43	-2675 -381	-1856 399	-515 106	-608 -626	1502 210	-2370 -466	-1444 -720	571 275	-1949 394	1876	419	-764 359	-822 117)	-1976	-2538	-1856	26600%
·	-14-3	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	1020	- 210	-400	-120	2/5	394	45	96	359	11/1	-369	-294	-249	
	1	-0104	3101		1119	701	-1010	—													
156(G)	-3239	-3869	516	-2361	-6355	3646	-3337	-5629	-3816	-5498	4951	-2619	-1905	-3167	-4377	-3211	-3632	-4837	4895	-4826	28700%
	-149	-500	232	44	381	399	105	-627	211	-466	-721	277	393	45	95	359	117	-368,	-295	-250	لنسبب
<u></u>	-155	-3318	-9181	-2159	-366	-701	-1376		<u>'                                    </u>												
157(G)	753	-2516	-789	486	-2848	2300	-672	-2582	596	-2529	-1627	481	-2112	-224	674	neal	40045	ation	ocos!	0022	4745.007
. 107(0)	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	720	275	394	45	471 96	-962 359	-1024 117	-2149 -369	-2694 -294	-2033 -249	27300%
	-8	-8139	-9181	-894	1115	-701	-1376	-	·	100	120]		034	70]	70			-00-4	201	-240	
									·····		-										
158(G)	-52	-2212	-3792	-4133	-4698	3627	-3943	4580	-4356	4812	-3907	-3056	-3216	-3901	-4170	-1874	2095	-3384	-4734	4766	27400%
<u> </u>	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	•720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
<del></del>	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
159(V)	-2485	-2030	-5123	4769	-2667	-4797	-4593	2349	-4661	-1545	-1424	4502	-4648	-4554	4752	-4115	825	2986	-4159	-3678	27500%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	2(300 K)
_	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378									000,					
	T			1																	
160(P)	-2541	-3139	-2413	-2753	-4726	-2991	-3342	-5055	-3527	-5058	4393	1199	4031	-3244	-3757 96	-2665	-2911	-4148	-4583	-4362	27610%
· 	-149 -8	-500 -8139	-9181	-894	-381 -1115	399 -701	106 -1378 '	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-369	-294	-249	
	1 -9	-0109	-3101	-034	-(1)0	-701	-(310)														
161(C)	1577	3078	1357	-656	-2664	-219	891	-2359	-617	-2434	-1576	-891	2199	-545	-1093	872	-1043	-1946	-2701	-2102	27700%
	·149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9161	-894	-1115	-701	-1378	ľ													!
4000	1 0440	- AIÂI	amri .	FORE	enzal	2004	40001	4207	- A2001	56(4	Anna	1000	2000	0.000	4647	- 100	4113	10 40	4470		
162(L)	-2140 -149	-2404 -500	-3995 233	-3997 43	-2053 -381	3121 399	-3283 106	-1687 -626	-3689 210	3041 -466	-720 -720	-3360 275	-3626 394	-3433 45	-3567 96	480 359	-2414 117	-1973 -369	-3145 -294	-2755	27800%
<u> </u>	-143	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	-920	410	-400	-120	414	054	40	49	202	1111	-303	-234)	-249	
	<u> </u>	-0100	- 31011	***		-701	-1010	<u></u>									<del></del>			<u></u>	
163(1)	-2527	2092	-5072	-4613	2047	-4674	-3911	2668	-4413	117	-841	-4323	-4439	-4023	<b>-4320</b>	-3916	-2488	2176	-3342	-3040	27900%
	•149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	<b>-4</b> 66	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	1376											;			
164(A)	3631	-2768	-4492	-4815	-4888	-2992	-4271	-4781	4818	-5025	-4365	-3727	-3728	-4477	4545	-2567	-2762	-3852	4724	4942	28000%
ionpy.	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	2000 A
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	1378						***	14	- "			010[		614	, .
																		···			
165(V)	-2623	-2122	-5301	-4990	-2770	-5102	-5132	2426	-4946	-1532	-1474	-4791	4869	-4891	-5102	-4483	-2619	3200	4506	-3991	28100%
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-369	-294	-249	
<u></u>	-8	-0139	-9161)	-894	-1115	-701	-1376							·							<del></del>
66(H)	-495	-2631	903	-2051	722	-3242	3763	-2386	-2056	-2342	-1663	-2047	-3330	-1815	-2362	-2318	-2233	-2272	-981	3316	28200%
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-29	-249	20240 14
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	· **			,,,,	<u> </u>									
67(0)	-4589	4392	-3927	-4146	-5099	-4221	-4099	-5973	-3840	-5564	-5304	-4230	4693	4575	3828	-4704	-4772	-5612	4577	-4751	28300%
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-234	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378				<del></del>								<u> </u>		
68(D)	-2873	-4505	3943	-902	-4948	-2833	-2157	-5087	-2604	-4922	4387	428	3235	-1872	-3575	-2522	-3009	4491)	4932	-3946	28400%
<u></u>	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	-249	
																					7

	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378			<u> </u>											
169(A)	** 1716	1181612 212500	214	118	11:21696	2012	816	129	7327750	5.52	1180	943	(F1212)	53B	, 1013	* 21056	1834	1275	(51958	× 635	28500 V
A STATE OF THE STA	ranikara Panikara	ii: 8139	91B1	- KBH	1994116	#EX101	**************************************	D-3094	britane	CARCARY CONCESSION	electrical.	in and	Sichelly Richtsch		eci-merini	umpo) uminum	ing ing ing		S-204	- 140 - 170 gra	ing (Salah) Terretakan dari Terretakan dari
170(S)	-1545 -149	-2420 -500	1001	-1518 43	-4049 -391	-2206 - 399	-2206 108	-3839 -626	-2264 210	-1938 -466	-3103 -720	-162ñ 275	-2814 394	-1909 45	-2758 98	2665 359	2313 117	-3045 -369	4143	-3590	28600%
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376	-020	1	**08)	-120	210	334	49	30]_	309	1111	-303	-294	-249	
171(G)	-2999 -149	-3461 -500	-2978 233	-3207 43	-5161 -381	3669 399	-3454 105	-5283 -626	15 210		-4565 -720	-3174 275	-3946 394	-3312 45	-3140 98	-3128 359	3317	-4492 -369	-4622 -294	-4749 -249	28700%
	-8	-8139	-9181	894	-1115	-701	-1378		,	***				- 190	- 30			- 603			
172(N)	-687 -149	-2349 -500	·736 233	911 43	-2668 -361	-1850 399	-618 106	-2415 -628	711 210	·2363	-1440 -720	1660 275	-1954 394	436 45	799 98	671 359	1230 117	-539 -369	•2534 •294	-1855 -249	28800%
	-8	-8139 -	-9181	-834	-1115	-701	-1378	·													
173(A)	3631 -149	-2768 -500	-4492 233	4815 43	-4868 -381	·2992 399	-4271 106	-4781 -625	-4818 210	-5025 -466	4365 -720	3727 275	-3728 394	-4477 45	·4545 96	-2567 369	-2762 117	-3852 -369	-4724 -234	-4942 -249	26990%
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
174(K)	-1368 -149	2597 500	-1358 233	-720 43	-2953 -381	-2298 3 <b>9</b> 9	1933 108	-2603 -626	1975 210	851 456	-1706 -720	-958 275	-2360 394	859 45	1012 96	-1273 359	1094	-2245 -369	-2690 -294	-2165 -249	29000%
	-8	-8139	-91B1	-894	-1115	-701	-1378°				<del></del>			·		···	<del>,-</del>	<del></del>		<u>`</u>	<del></del>
175(D) .	-27 -149	-2613 -500	2320 233	1049 43	-2923 -381	-1962 399	1973	-2684 -628	544 210	-2624 -466	-1712 -720	1408 275	-2115 394	345 45	-869 98	969 359	-1056 117	-2231 -369	-2793 -294	-2087 -249	29100%)
	8	-8139	-9161	-894	-1115	-701	1378														
176(1)	-1096 -149	-938 -500	233	-2658 43	-899 -381	-2643 399 -701	-1513 105 -1378°	1265 -626	1006 210	1388 -455	-124 -720	-2232 275	-2668 394	-1950 45	∙2151 98	•1725 359	311 117	1669 -369	·1425	-249	29200%
177(A)	3342	-8139 -1825	-9181 -4061	-834) -4295	-1115 -4368	. 111	-1575	4129	4159	-412	-3484	-2820	-2903	3689	3929	-1469	409	-2849	4593	4508	293001/
	-149	-1026 -500 -8139	233 -9181	43	-381 -1115	399	106	626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	294	-249	1999071
178(L)	-4414	-3800	-5638	-5628	-2290	-4980	4626	-1886	-5423	3316	•1236	·5514	4997	-4750	-5002	-5379	4399	-2629	-3665	-3690	29400%
	-149	-500 -8139	233 -9181	43	-381 -1115	399 -701	106	-626	210	-456	-720	275	394	45	96	359	117	369	-294	-248	
179(S)	2216	-1831	-3961	-4157	-4409	656	-3603	4213	4076	-4452	-3514	-2782	-2892	-3513	-3895	2686	-1675	-2982	4623	-4523	29500%
	-149	-500 -8139	233 -9181	43 -894	-381 -1115	399 -701	106 -1378	-628	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
180(Y)	3634	-3050	-4918	-4972	36	4597	-1405	223	-4437	-250	-1998	-3545	-4494	-3522	-4004	-3782	-3536	-2621	2928	4349	29500%
	-149 -6	-500 -8139	233 -9181	43 -894	-381 -1115	395 -701	105 -1376	-528	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
181(A)	3391	-1860	3998	4279	-4411	-2128	-3684	-4207		-4490	-3565	-2837	-2929	-3729	-3959	706	-1716	-3001	4536	4534	29700%
	-149 -8	-500 -8139	23.) -9181	43 -894	-381 -1115	899 -701	105 -1378 °	-528	210 •	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-384	-249	·
182(K)	370	307	113	-351	-2280 -381	-1925	-615 106	324 -626	1883	-2040	-1194	-632 275	-2022 384	-205 45	-736 96	1541 359	14	-1628 -369	-2330 -234	-1726 -249	29800%
	-149 8	-500 -8139	233 -9181	-894	-361	399 -701	-1378	-626	210	-466	720]	213	324	93]		309	ш	1000	•201	-240	<del></del>
																	<del></del>				

182(C) {	2572			March Marchael	4575		318			7.466	376	2958	3070	3837	4092	1679	1898	3191	4701	4686	2910078
	149 1 8		23) 9181	1.5 % 28 %		399 701		eran <b>626</b> Steware	∋ix- <b>.210</b> Stoken	464 461	-51-720	ista 175 Reguer	394	6 45 V	96	43 <b>359</b> (	iioiMi Banks	aa <b>.369</b> <i>aa.</i> 466	72.4	249	
184(1)	-2178 -149	-1808 -500	-4630 233	4153 43	-2034 -381	-4190 399	-3417 106	3121 -625	-3909 210	-456	-1023 -720	698 275	-4099 394	-3656 45	-3864 96	-3388 359	-2148 117	1742 -369	-3147 -284	-2761 -249	30006%
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378		•											••••	
185(G)	-4435	-4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5548	-5385	-4727	-4815	-5862	-4924	-5849	30100%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	· <b>62</b> 6	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-369	-294	-249	30,00%
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	·	<u>'</u>												
186(G)	1392	2751	-4353	4536	-4308	2864	-3681	-4084	-4233	-4354	-3425	-2859	-2890	-3744	3957	712	-1658	-2914	4553	-4470	30200%
	-149 -8	-500 -8139	233 •9181	-894	-381 -1115	399 -701	106 -1378	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	234	-249	
				·																	
197(G)	855 -149	-1822 -500	-3738 233	-3769 43	-4188 -381	2507 399	-3358 106	-3950 -626	-3667 210	-4196 -466	-3283 -720	-2667 275	986 394	-3302 45	-3621 96	-1441 359	2334	-2867 -369	-4408 -294	-4238 -249	20300%
	-8	-8139	-9181	-694	-1115	-701	-1378	1	1	400	-1201	- 279	324	40	30]	343		-303	-234	-2+3	
88(R)	-3706	-3692	-4430	-3846	1391	-4057	-2273	-3795	-1906	-3356	-3181	3458	-4263	-2675	3948	-3768	-3671	-3813	-2293	-1328	30400%
190(1)	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-234	-249	3040070
	-155	-8139	-3345	-894	-1115	-701	-1376														
189(A)	2844	-1670	-3814	-3873	4048	-1958	-3318	-3787	-3686	-4061	-3156	-2598	-2734	-3301	-3572	1088	1907	-2713	4286	-4136	38500%
	-149	500	233 -9034	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-7992	-3004	-894	-1115	-1303	-750	<u> </u>						<del> </del>			<del></del>				
190(G)	4176	-3995	4655	-5222	-5686	3828	-4823	-5386	-5533	-6087	-5741	-4896	-4606	-5312	-5176	-4461	-4560	-5613	4754	-5635	30500%
-	-149 -8	-500 -7992	233 -9034	-894	-381 -1115	.399 -422	106 -1980	-626	210	·466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
0446	À100	- March	r And			ingel		or and	4000	42.10	1454	47.89	4040	Jesal	1701	4440	200	Antal	(464)	9700	********
91(V)	-2496 -149	-2036 -500	-5139 233	-4788 43	-2880 -381	-4825 399	-4537 106	2522 -626	-4686 210	-1549 -466	-1431 -720	-4527 275	-4668 394	-4584 45	-4783 98	-4148 359	629 117	2919 -369	-4191 -294	-3706 -249	30700%
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378								==:1_						
92(1)	-2760	-2307	-5270	-4785	1172	-4884	-3992	3346	4576	662	-572	-4539	4535	-4008	-4400	-4134	-2703	757	-3223	-3041	30800%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	<b>-36</b> 9	294	-248	
	-8	-8139	9181	-B94	-1115	-701	-13/8		<u> </u>	·				· · ·							·
93(E)	454	-3086	-801	3279	4125	-2346	-1868	-3919	-1868	-3932	-3156	-1291	1208	-1533	-2450	-1842	-2097	-3305	4121	-3395	30900%
·	-149 -8	-500 -8139	233 -9181	43 -894	-381 -1115	399 -701	106 -1378	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
									<del></del>										· · · · · ·		
194(T)	-2738 -149	-3109 -500	-4509 233	-4810 43	-4918 -381	-3305 399	-4346 106	-4865 -628	-4769 210	-5072 -466	-4551 -720	-3987 276	-3998 394	-4580 45	-4545 96	-2999 359	4033 117	-4113 -369	-4684 -284	-4915 -249	31000%
	-8	-8139	-9181	-834	-1115	-701	-1376			1700]	-120	214		70]	399	339	***	- 1000	-2271		
95(T)	-1323	-1975	-276 <del>6</del>	-2978	-4207	-2152	-3105	-4004	-3295	-4229	-3354	134	-2901	-2988	-3387	-113	3742	-2969	-4405	-4119	31160%)
<del>~(')</del>	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	911\$11/4]
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
96(F)	4110	-3437	-5436	-5431	4216	-5143	-2169	-1742	-5074	563	-1124	-4290	4871	-3987	-4561	4547	-4016	-2374	-1356	-292	31200%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	كنب
	-8	-8139	<b>-91</b> 81	-894	-1115	-701	-1378										<del></del>				
97(K)	-111	-2844	-1470	1220	-3294	-2415	-860	-2939	2448	-2798	-1945	-1056	2475	767	2054	1421	-1432	-2644	-2868	-2356	31300%
	-149	-500	233	43	-361	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378		· -												
198(E)	545	-3735	1715	2880	3981	-2308	-1442	-3816	-1408	-3725	-2924	-909	-2713	1281	-2087	-1777]	-2011	-3331	-3909	-3048	31400%
	-149	-500	233	43	-381	399	186	-626	210		-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	- VI-100 /c
<u> </u>	-9	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-137B		1												
199(E)	4574	4565	-2714	3919	-5655	-3995	-3886	-6219	4238	-5698	-5604]	-3415	-4513	-3838	-4570	-4456	4726	-5788	4878	-5197	31500%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-456	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-248	\$1900
	-8	8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376		ı												
200(T)	-1211	1331	-3446	-2962	-1399	-2495	-1930	-869	-2610	-1374	-769	-2403	-2615	-2309	-2526	- 1585	3305	195	-1933	1430	31608%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	626	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-359	-294	-249	V100020
	-8	-6139	-9181	-894	-1115	-701	-1378		<u>'</u>												
201(E)	-1941	-3222	-921	3293	-3618	-2473	-1316	-3186	916	-3225	-2465	-1147]	-2749	-923	-1064	-1790	-1902	-171	-3398	-2802	31700%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-365	-284	-249	VIIV
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
202(1)	-1286	∙1B98	-3764	-4016	-4329	-2157	-3572	-4120	-3959	-4408	-3517	-2789	2947	-3588	-3797	697	3756	-2989	4554	-4399	31806%
	-149	-500	233	43	-391	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-369	-284	-249	A 1989 (C
	-8	-8139	-9161	-894	-1115	-701	-1378 '														<u> </u>
203(D)	4580	-4701	4174	-3014	-5700	-3967	-3905	-6376	4478	-6024	-5744	-3355	-4501	-3B70)	-4926	-4440)	4750	-5894]	4922	-5231	31900%
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-456	-720	275	394	45	96	359	117	-359	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														·
204(L)	-3785	-3122	-6060	-5527	-1359	-5814	-4569	1065	-5292	3069	-146	<b>-5564</b>	4963	4163	-4828	-5215	-3571	-1279	-3159	-3298	32000%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	·626	210	466	-720	275	394	45	\$6	369	117	-369	-294	-249	OLOVO K
$\cdots$	-6	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
205(F)	3171	-3220	-5271	-5259	4266	-4892	-2120	417	4916	-1143	-1314	-4142	4753	-3956)	-4473	-4270	-3740	-1899	-1349	-289	32100%
	-149	-500	213	43	-381	399	106	-626	210	456	-720	275	384	45	98	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-13701														
206(G)	4135	4203	-5092	5462	-5893	3834	5028	-6627	5765	-8237	-5970	-5141	4804	-5546	-5385	4727	-4815	-5862	4924	-5849	32200%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	276	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	·1378														
207(E)	4574	4665	-2714	3919	-5655	-3995	-3886	-6219	-4238	-5898	-5604	-3415	4513	<b>-3338</b>	4570	-4455	4726	-5786	-4878	-5197	32300%
•	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-456	-720	275	394	45	96	359	117	-369	294	-249	***************************************
	-8	-8139	-9181	-854	-1115	-701	-1378														
208( <b>0</b> )	-3157	-3746	-3170	-2450	-4497	-3515	-1763	-4151	443	-3809	-3189	-2392	-3620	4200	1284	-3063	-2944	-3900	3556	-3420	32400%
	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
· l	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	·1378 °														<del></del> ,
209(A)	2672	-1334	-3316	-2853	-1740	371	-2072	483	-2577	-1549	-928	-2359	-2798	-2295	-2567	-1629	191	932	-2245	-1899	32500%
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	-249	
<u> </u>	-6	-6139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
210(V)	-2620	-2125	-5293	-4983	-2755	5076	-5100	1877	4932	-1522)	-1466	-4777	-4855	-4870	-5062	-4456	-2619	3416	-4480	-3989	32500%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	294	249	
<u> </u>	-8	-8139	-9191	-694	-1115	-701	•137B	,													
211(L)	-4414	-3800	-5638	-5628	-2290	4980	-4528	-1886	-5423	3316	-1236	-5514	-4997	4750	-5002	-5379	-4399	-2629	-3665	-3690	32700%
• • •	-149	·500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	· 45	98	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-694	-1115	-701	-1376*	1													

212(C)	-2243	5944	-4840	-4445	-1998	-3905	-3598	-31	-4138	449	-930	-3902	4040	-3718	-4010	-3184	-2306	1347	-3209	-2883	32800%
-	-149	-500 -8138	233 -918i	-894	-381 -1115	. 399 -701	106 -1378	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-284	-249	
213(G)	-4435 -149	-4203 -500	-50 <b>9</b> 2	-5462 43	-5893 -381	3834 399	-5028 106	-6627 -626	-5765 210	-6297 -466	-5970 -720	-5141 275	-4804 394	-5546 45	-5385 95	-4727 359	-4915 117	-5862 -369	-4924 -294	-5849 -249	32900%
	-8	-8139	-91BI	-694	-1115	-701	-137B	- 1	219	****	-120	279		761		999	- 1111		-271	-243	
214(G)	-677	-2128	-3838	4171	-4647	3536	-3816	-4506	4310	-4749	-3857	-3809	-3149	-3871	-4137	-1784	-2005	-3297	4725	4735	33000%
•	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	99289 /5
	-6	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														· · · · · ·
215(V)	378	724	-3707	-3104	-1180	-2986	-1919	1210	-2734	1302	-359	-2627	-3014	-2382	-2566	-2089	1123	1949	-1773	-1423	33100%
	-149	-500 -8139	233 -9161	43	-381 -1115	399 -701	106 -1376°	-626	210	466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	-249	
	-0	-5105	-3101	-094	-1110	-//1	-1310												<del></del> _		
218(N)	-948	-1407	-1515	158	-1452	-2164	1677	-1030	-821	-1302	1976	-1113	2245	-718	-1173	773	1715	1332	-1794	-1343	33200%
-	-149	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	106 -1376	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
217(E)	1397	-2528 -500	-725 233	2286 43	-2932 -381	240 399	-791 106	-2681 -626	328 210	-2646 -466	-1744 -720	-674 275	-2162 394	-351 45	-939 96	545 359	-1095 117	-2227 -369	-2828 -294	-2143 -249	33300%
-	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
218(L)	-3705	-3122	-6060	-5527	-1359	-5814	-4569	1065	-5292	3069	-146	-5564	<b>-49</b> 63	·4163	-4828	-5215	-3671	-1279	-3159	-3198	33400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-854	-1115	-701	-1378														
219(V)	-2600	-2108	-5251	-4894	-2568	-5025	-4783	2479	-4810	-1354	1358	-4683	4772	-4654	-4895	-4362	-2594	3018	-4181	-3758	33500%
	-149 -8	-500 -8139	233 -9181	43 -894	-381 -1115	399 -701	106 -1378)*	626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-243	
	-0	-0103	-31011	-034	11119	-7011	-10104														
220(K)	-1633	-2905	-1573	708	-3375	-2487	-900 106	-3003 -628	2925	-2849	-2008 -720	-1128 275	-2541 394	1714 45	784 96	-1509 359	-105 117	-2617 -369	-2894 -294	2418	33600%
-	·149	-500 -8139	-918	-894	-381 -1115	399 -701	-1378	*920	210	466	-120	210	124	40	30	309	111	-903	-274	-249	
594/A)	2352	1000	nconi	2000	0.876	7124		-486	-32	-832	74.1	-1817	-2498	-1493	4700	4400	27.1	453	4440	501	1036166
221(A)	-149	2066 -500	-2693 233	-2000 43	-947 -381	-2434 399	-1271 106	-626	210	466	714 -720	275	394	45	-1792 96	-1483 359	274	453 -369	-1419 -294	-249	33700%
	-8	-8139	-9181	-894	·1115	-701	-1378]	·													<u> </u>
222(G)	224	-1905	-3562	-3696	-3684	3361	-3297	-3220	-3625	81	·2886	-2733	-2977	-3326	-3545	-1606	-1763	-2574	4068	-3810	33800%
	-149	500	233	43	-381	199	106	-676	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	<del></del>
-	-6	-6139	-9181	-694	-1115	-701	-1378											<del></del>			<del></del>
223(F)	4781	-3756	-5207	-5542	4341	·5070	-1342	-3653	-5111	-2071	-3065	-3743	-4949	-3874	-4496	-4351	-4650	-3829	-691	1725	33900%
<u> </u>	-149	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	106 -1376*	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	369	-294	-249	
			-41011	-003		-101		L													
224(E)	-2413 -149	-4114 -500	221	3465 43	-4392 -381	-2485 399	-1689 106	-4248 -626	-1608 210	-4112 -466	-3396 -720	-1094 275	-2951 394	-1336 45	871 96	-2119 359	-2441 117	-3763 -369	-239 -294	-3395 -249	34000%
F	-145	-8139	-9181	894	-1115	-701	-1378	-010	210	-400	-120]	219	324	49	30	993	- 114	-003	-234]	-743	
995CT. 2				9638		4100		lines	late)	onenl	וואלו	annd	9024	Apocl	oos!	47.10	2221	FAO	10001	Age il	9445080
225(T)	-1461 -149	-1864 -500	-3139 233	-2645 43	-2659 -381	-2483 399	·2136	-1734 -626	-1646 210	-2359 -466	-1761 -720	-2298 275	-2936 394	·1995 45	920 96	-1748 359	3354 117	967 -369	-2989 -294	-2654 -249	34100%
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
226(L)	-3831	-3266	-5314	-5148	-673	-5068	-2476	-1443	-4706	3059	-789	-4359	4756	-3864	4314	·4462	-3729	-2115	-1672	1736	34200%
	-149	-500	233	43		399	106	-626	210	-466	-720	276	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

220(0)   -1818   -1886	-3608 34900% -249 -3920 34400% -249 -249 -5849 34500% -249 -1941 34900%
1483   596   233   448   588   5118   701   1310   1	-249] -3520] 344007/ -249] -2174] 345007/ -249] -5849] 345007/ -249] -4616] 347007/ -249]
4-6	-3820] 344007/ -245]  -2174] 345007/ -249]  -5849] 345007/ -249]  4616] 347007/ -249]
1468   4500   233   445   358   558   606   4525   210   4466   7720   2773   384   45   96   348   117   358   25	-245] -2174 34500%] -249 -5849 34500%] -249 -4616 34700%]
1468   4500   233   445   358   558   606   4525   210   4466   7720   2773   384   45   96   348   117   358   25	-245] -2174 34500%] -249 -5849 34500%] -249 -4616 34700%]
Second Color   Seco	-2174 34500% -249 34500% -5949 34600% -249 34700% -249
	-5648  34500%  -249  4516  34700%
	-5648  34500%  -249  4516  34700%
	-5843  34500%  -249  4618  34700%  -249
330(9)   4435  4203   5992  5462   5593  3354   5028   4627   5769   6227   5769   6227   5769   5141   4609   5546   5899   4727   4619   5862   4928   4929   4169   5600   233   43   381   398   106   6228   210   456   720   216   384   45   56   389   117   388   288   231(7)   4093   3483   4921   5048   109   4109   1595   528   210   466   720   216   389   45   56   359   117   368   288   231(7)   4493   3483   4921   5048   109   4109   1595   528   210   466   720   216   389   46   56   359   117   368   288   233(7)   4111   2410   772   924   2733   399   106   528   210   466   720   217   394   46   96   359   117   389   238   238   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239   239	-249 4618 34700% -249
- 1489 -500	-249 4618 34700% -249
- 1489 -500	-249 4618 34700% -249
231(Y) 4699 3483 4921 5048 109 4705 1555 2544 4494 2334 2010 -3723 4707 -3735 4111 4665 4068 -3172 40 1 149 500 233 43 381 399 106 626 2110 466 720 275 384 45 56 359 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355 23 117 -355	-249
- 149 - 500 233 43 389 399 105 528 210 466 - 720 275 384 45 96 359 117 - 358 - 23  - 9 8139 - 9181	-249
- 149 - 500 233 43 389 399 105 528 210 466 - 720 275 384 45 96 359 117 - 358 - 23  - 9 8139 - 9181	-249
9 -8133 -9181 -994 -1116 -701 -1378'	
233(Q) 1711 -2410 -772 934 -2739 -1925 -634 -2477 -171 -2433 -1524 -574 -2035 2086 345 902 -923 -2642 -266149 -500 233 43 -381 399 105 626 210 -466 -720 275 394 45 96 359 117 -359 -298 -8139 -9161 -994 -1116 -701 -1376' 149 -500 233 43 -381 399 105 -626 210 -466 -720 276 394 45 96 359 117 -359 -298 -8139 -9161 -994 -1118 -701 -1376' 149 -500 233 43 -381 399 105 -626 210 -466 -720 276 394 45 96 359 117 -359 -298 -8139 -9161 -994 -1118 -701 -1376' 18 -8139 -9161 -994 -1118 -701 -1376' 18 -8139 -9161 -894 -1118 -701 -1376' 18 -8139 -9161 -894 -1118 -701 -1376' 143 -500 233 43 -381 399 105 -626 210 -466 -720 276 394 45 96 399 117 -369 -2918 -8139 -9161 -894 -1118 -701 -1376' 143 -500 233 43 -381 399 105 -626 210 -466 -720 275 394 45 96 399 117 -369 -2918 -8139 -9161 -894 -1118 -701 -1376' 143 -500 233 43 -381 399 105 -626 210 -466 -720 275 394 45 96 399 117 -369 -2918 -8139 -9161 -894 -1118 -701 -1376' 149 -500 233 43 -381 399 105 -626 210 -466 -720 275 394 45 96 399 117 -369 -2919 -8139 -9161 -894 -1118 -701 -1376' 149 -500 233 43 -381 399 105 -626 210 -466 -720 275 394 45 96 399 117 -369 -2919 -8139 -9161 -894 -1118 -701 -1376' 149 -500 233 43 -381 399 105 -626 210 -466 -720 275 394 45 96 359 117 -369 -2919 -8139 -9161 -894 -1118 -701 -1376' 149 -500 233 43 -381 399 105 -626 210 -466 -720 275 394 45 96 359 117 -369 -2919 -8139 -9161 -894 -1118 -701 -1376' 149 -500 233 43 -381 399 106 -626 210 -466 -720 275 394 45 96 359 117 -369 -2919 -8139 -9161 -894 -1118 -701 -1376' 149 -500 233 43 -381 399 106 -626 210 -466 -720 275 394 45 96 359 117 -366 -28149 -500 233 43 -381 399 106 -626 210 -466 -720 275 394 46 96 359 117 -366 -28149 -500 233 43 -381 399 106 -626 210 -466 -720 275 394 46 96 359 117 -366 -28149 -500 233 43 -381 399 106 -626 210 -466 -720 275 394 46 96 359 117 -366 -28	-1941/ 9490AV
- 149 -500 233 43 -381 399 105 -626 210 -466 -720 275 384 45 96 359 117 -369 -29 -29 -23 -23 -24 -467 -476 -23 -24 -23 -24 -23 -24 -24 -24 -25 -24 -25 -24 -25 -24 -25 -24 -25 -24 -25 -24 -25 -24 -25 -24 -25 -24 -25 -24 -25 -24 -25 -24 -25 -24 -25 -24 -25 -24 -25 -25 -25 -25 -25 -25 -25 -25 -25 -25	-1941 9490AFV
233(P) 3403 4071 -1922 817 5220 -3359 3173 -5423 -3337 -5281 4771 -2564 4045 -2983 -3760 -3320 -3524 -4817 476 - 1449 5600 233 43 -381 399 105 -626 210 466 -720 276 384 45 96 359 117 -359 -28 - 8 -8139 -9181 -894 -1116 -701 -1378' - 149 5600 233 43 -381 399 105 -626 210 466 -720 276 384 45 96 359 117 -359 -28 - 234(E) -2670 4766 1266 3567 4993 -2500 -2068 -5026 -2483 4852 -303 -1212 -3168 -1766 -3456 -2484 -2974 -4467 -495 - 149 500 233 43 -381 399 105 -626 210 466 -720 275 384 45 96 359 117 -369 -28 - 8 -5139 -9181 -884 -1115 -701 -1378 ' - 149 500 233 43 -381 399 105 -626 210 466 -720 275 384 45 96 359 117 -369 -28 - 149 500 233 43 -381 399 105 -626 210 466 -720 275 384 45 96 359 117 -369 -28 - 149 500 233 43 -381 399 105 -626 210 466 -720 275 394 45 96 359 117 -369 -28 - 149 500 233 43 -381 399 105 -626 210 466 -720 275 394 45 96 359 117 -369 -288 -8139 -9181 -894 -1115 -701 -1378' '8 -8139 -9181 -894 -1115 -701 -1378' '8 -8139 -9181 -894 -1115 -701 -1378' '8 -8139 -9181 -894 -1115 -701 -1378' '	-249
- 1449 - 500	<del></del>
- 1449 - 500	4636 34900%
234(E) -2670	-249
. 1449 -500 233 43 -381 399 106 -626 210 466 -720 275 334 45 96 359 117 -369 -298 -8139 -9161 -894 -1115 -701 -1378' '  235(M) 3(8) -2619 -5526 4976 -1443 -5126 4045 653 4736 1429 4289 4803 4610 -3916 -4423 4378 -2995 1140 -305149 -500 233 43 -381 399 106 -626 210 466 -720 275 394 45 96 359 117 -369 -298 -8139 -9181 -894 -1115 -701 -1378' '  235(A) 3631 -2768 -4492 4815 4888 -2992 4271 -781 4818 -5025 4369 -3727 -3728 4477 4545 -2567 -2762 -3852 472149 -500 233 43 -381 399 136 626 210 466 -720 275 394 46 96 369 117 -369 -29149 -500 233 43 -381 399 136 626 210 466 -720 275 394 46 96 369 117 -369 -29149 -500 233 43 -381 399 136 626 210 466 -720 275 394 46 96 369 117 -369 -29149 -500 233 43 -381 399 136 626 210 466 -720 275 394 46 96 369 117 -369 -2919 -3139 -3161 -694 -1115 -701 -1376' 1 -3781 -4918 -3013 -3107 -3741 -4951 -3876 -4497 -4354 -4666 -3859 -68	
. 1449 -500 233 43 -381 399 106 -626 210 466 -720 275 334 45 96 359 117 -369 -298 -8139 -9161 -894 -1115 -701 -1378' '  235(M) 3(8) -2619 -5526 4976 -1443 -5126 4045 653 4736 1429 4289 4803 4610 -3916 -4423 4378 -2995 1140 -305149 -500 233 43 -381 399 106 -626 210 466 -720 275 394 45 96 359 117 -369 -298 -8139 -9181 -894 -1115 -701 -1378' '  235(A) 3631 -2768 -4492 4815 4888 -2992 4271 -781 4818 -5025 4369 -3727 -3728 4477 4545 -2567 -2762 -3852 472149 -500 233 43 -381 399 136 626 210 466 -720 275 394 46 96 369 117 -369 -29149 -500 233 43 -381 399 136 626 210 466 -720 275 394 46 96 369 117 -369 -29149 -500 233 43 -381 399 136 626 210 466 -720 275 394 46 96 369 117 -369 -29149 -500 233 43 -381 399 136 626 210 466 -720 275 394 46 96 369 117 -369 -2919 -3139 -3161 -694 -1115 -701 -1376' 1 -3781 -4918 -3013 -3107 -3741 -4951 -3876 -4497 -4354 -4666 -3859 -68	-3925 35000%
	-249
	٠ لتقد
	-3074 <b>35100</b> %
236(A) 3631 -2768 -4492 -4815 -4868 -2992 -4271 -4781 -4818 -5025 -4369 -3727 -3728 -4477 -4545 -2567 -2762 -3852 -472 149 -500 233 -43 -381 -399 106 -628 210 -486 -720 275 -394 -46 96 369 117 -369 -28 8 -8139 -9101 -894 -1116 -701 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 -1378 - 2870 - 2870 -1378 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 2870 - 28	-249
149 - 500 233 43 - 381 398 106 - 628 210 - 446 - 720 275 394 46 96 369 117 - 368 - 28 	
9 -9139 -9191 -934 -1115 -701 -1376 ' '   -237(v)   -4797 -3764 -5203 -5543 1114 -5059 -1339 -3694 -5111 -3013 -3107 -3741 -4951 -3876 -4497 -4354 -4666 -3859 -58	-4942 <b>35</b> 200%
237(Y) 4797 3764 5203 5543 1114 5059 1399 3694 5111 3013 3107 3741 4951 3876 4497 4366 3859 58	-249
	·
	4723 35300%
	-249
- 8 -8139 -9181 -894 -1115 -701 -13781 '	
239(F) 3828 3505 4146 4035 4292 4207 2060 3492 774 3071 3005 3656 4434 3287 2287 2282 3868 3856 3871 -158	
- 149 500 233 43 381 399 106 626 210 466 720 276 394 45 96 369 117 369 22 - 8 8139 8181 894 1115 701 1370 1	494 \$5400%
- 1 0 000 001 000 1110 001 1000 1 1	-494 35400% -248
239(E)   2775 4471 511 3552 4815 2610 2657 4863 2317 4711 4124 1234 3162 1755 3103 2442 2384 4306 475	
149 -500 233 43 -381 399 106 -525 210 456 720 275 394 45 96 369 117 -369 -29	-249 -3820 35500%
- 9 -9(39) -9(91) -894 -1115 -701 -1378) (	-248
240(C)   -1407  6022  4397  4323  3016  2468  3398  -1251  3952  2540  2082  3044  3133  3588  3744  -1803  1473  1126  367	-249 -3820 35500%
- 149 500 233 43 381 399 106 626 210 466 720 275 394 45 96 359 117 369 -28	-249 -3820 35500% -249
· -8 -8139 -9181 -834 -1115 -701 -1318 <sup>1</sup> '	-249 -3820 35500% -249 -3390 35600%
	-249 -3820 35500% -249

241(L)	-3370	-2847	-5795	-5233	-1380	-5465	-4298	70B)	-5010	2859	1349	-5155	477)	-4026)	-4522	-4755	-3254	814)	-3103	-3213	957/00
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	276	394	45	96	359	117	-369	-3103	-249	35700%
	£	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378				- 1231				<u></u>						
	27/2																	2.22			
242(H)	-251S -149	-4224 -500	233	946	-4287 -381	-2505 399	4583	-4377 -626	-1764 210	-4237 -466	-3571 -720	2007 275	-3009 394	-1439 45	-2361 96	-2209 359	-25 <b>69</b>	-3893 -369	- <b>42</b> 67	-3353	35800%
	- 143	-8139	·9181	-834	-1115	-701	-137B	-040	210	400	-720	210	394	40	*64	198	111	-203	-24	-249	
	<u> </u>																				
243(E)	-3177	2571	-2701	3711	4851	-3438	-3479	-4765	-3558	-4932	4406	-3081	-4006	-3370	-3802	-3269	-3451	-4260	4554	-4524	35900%
	-149	·500	233	43	361	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9161	-894	-1115	-701	-1378													<u> </u>	
244(L)	-85	-1333	-3893	-3280	-1111	-3185	-2083	1066	-2910	2310	1961	-2823	-3170	-2501	-2721	-2289	-113	436	-1859	-1558	36000%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-234	-249	
	-8	8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378)														
245(16)	-2513	-3173	-2941	-2370	-4402	-309A	-1824	-3895	3666	-3734	-3068	-2271	-3377	-1447	-616	-2537	751	-3485	-3625	-3471	36100%
	-149	-500	233	43	-381	400	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	2010034
	155	-3318	-9181	-196	-2974	-701	·1378 °	<del></del> ,				=:-									
246(L)	-3571 -149	-3023 -500	-5954 233	-5375	-1321 -381	-5646 399	-4390 106	-632 -626	-5138 210	2962 -466	1671 -720	-5356 275	4852 394	-4044 45	-4689 98	-4963 359	-3436 117	742 -369	-3082 -234	-3239	36300%
	-8	-8139	-9161	-894	-1115	-701	-1378	-020		-400	•120	2/0	374	40	36	303	1111	•303	-234	-249	
	<u>`</u>	VIVI	4101		- 1119		1010					<del></del>									
247(1)	-2980	-2484	-5473	-5109	-1958	-5196	-4587	3728	-4915	267	-781	-4933	-4833	-4427	-4799	-4598	-2949	-64	-3627	-3397	36400%
	-149	-500	233	43	-181	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	;
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378,		1				<u> </u>								<del></del>
248(V)	1685	-1668	-4035	-3732	-2081	-3082	-2893	-227	-3402	-1488	1383	-3123	-3419	-3145	-3320	367	-1807	3332	-2874	-2504	36500%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-234	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	·1378°	i·													
249(D)	-2963	-4569	3864	-1039	-4953	-2751	-2187	-4998	767	-4822	4260	-1424	-3314	-1891	-3072	-2624	-3060	-4467	4770	-3912)	36600%
(43(D)	-149	-500	233	43	-361	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	3000076
	-8	-8139	-9181	-834	-1115	-701	-137B °	<del></del> ;				4,14									
250(L)	-2768	-2715	-4842	-4633	-1675	-399B	-3790	-1038	4207	3056	-562	-4150	-4179	-3740	-3989	-3399	699	-1545	3154	-3057	36700%
	-149	-500 -8139	-9161	-894	-381 -1115	399 -701	106 -1378	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	294	-249	
		-0100	-3101	*****	-1119	-101	-1010							<u></u>							
251(M)	-2822	-2356	-5342	-4861	-1759	-4985	4151	2587	-4663	173	4005	4649	-4601	4076	-1487	-4261	-2764	766	-3321	-3216	36800%
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-13781		لــــــــــــــــــــــــــــــــــــــ												
252(Y)	-4562	-3630	-5142	-5401	1516	-4992	-1300	-3544	4968	-2963	-2986	-3671	-4858	-3786	4393	381	-4432	-3662	2413	4375	36900%
	149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	334	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	·1378 `	ľ													
E 6	1050	9127	Ecol	1218	2044	4247	4440	2504	4468	1647	4754	4000	27/8	4070	1000	1767	cool	2464	12001	2000	97Door!
53(E)	-1959 -149	-3457 -500	-568 233	3135 43	-3641 -381	-2347 399	-1410 106	-3622 -626	-1165 210	-3647 -466	-2751 -720	-1000 275	-2716 394	1879 45	-1666 96	-1757 359	692 117	-3152 -369	-3709 -294	-2960 -249	37000%
	-3	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	-020		-9004	-120	219	- UJ-1		- 20		1111	-003	-2.74	-241	
		-107	- 17.1																		
54(G)	-347	-2818	-1215	201	-3253	2635	-921	-2921	1474	-2822	-1972	-1002	-2459	466	658	1397	-1435	-2621	-2923	-2378	37100%
]	-149	·500	233	43	-381	339	105	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376		1												
55(G)	4435	-4203	-5092	-5482	-5893	3834	-5028	-8627	-5765	-6297	-5970	-5141	4804	-5546	-5385	-4727	4815	-5862	4924	-5849	37200%
~~	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	·1378 °														
256(1)	-2042	-1759	-4321	-3740	-1316	-3753	-2668	3134	-3389	1017	1993	194	-3653	-2958	-3221	-2884	-1980	-344	-2325	-2073	37300%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	276	394	45	96	359	117	389	-294	-249	31000 K
<b> </b>	-8	-8139	-9161	-894	-1115	-701	-1376			_,											
257(A)	1914	-1640	-1237	128	-1748	-661	-793	-1355	-577	-49	-817	-905	-2155	498	-993	1037	162	-1149	-2002	624	37400%
	-149	-500	233	43	-381	399 -701	106	-626	210	-456	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9161	-894	-1115	-701	-1378	I	لــــــا												
258(N)	365	-3809	1001	557	4083	1196	-1518	-3930	-1535	-3838	-3055	3219	-2763	-1148	-2243	-1845	-2131	-3433	-4027	-3144	\$7500%
	-149 -8	-500 -8139	-9181	-894	-381 -1115	-701	-1378°	-626	210	-466	-720	275	394	45)	,36	359	117	-369	-294	-249	
259(M)	-3656 -149	-3153 -500	-5816 233	-5350 43	-1349 -381	-5421 399	-424B	-822 -626	-4928 210	948 -466	4920 -720	-5248 275	-4838 394	-4039 45	-4539 96	-4860 359	-3558 117	-1557	-3044	-3030	37600%
F	-8	-8139	-9181	-894	-1116	-701	-1376	•020	210	******	-120	તાય	374	40	39	338	11/	-369	-294	-249	
200	4014	45.44					4000														
260(R)	-1614 -149	-1949 -500	-2260 233	-1663 43	-886 -381	-2765 399	-1089 106	-1596 -626	-1089 210	360 -466	-1133 -720	2239 275	-2814 394	-1215 45	2408 96	-1789 359	-1535 117	-1468 -369	1995 -294	1546	37700%
	-8	-8139	-9181	-834	-1115	-701	-1378						994	- '9				- 444			
261(Y)	-1648	-2973	568	-509	-2846	2207	1172	-2986	444	-2341	-2110	1645	-2446	csol	escil	-1389	1500	2021	2024	2005	070000
•	·149	-500	233	43	-381	399	106	-526	441 210	466	-720	275	394	-659 45	-1264 96	359	-1509 117	-2582 -369	-2924 -294	3695 •249	37800%
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
262(S)	279	-1844	-3877	4131	-4448	136	-3634	-4260	4132	-4511	-3561	-2782	-2903	3646	-3936	3391	-1692	-3009	4661	-4586	37900%
•	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	294	-249	OI GOO A
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376														
263(1)	-2653	-2149	-5311	-4961	-2538	-5114	4905	2957	4891	332	-1267	-477d	-4827	4713	-4978	-4466	-2636	2521	-4218	-3821	38000%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-625	210	-466	-720	275	394	45	9.6	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	<u> f</u>					<del></del>								
264(S)	-2212	-2711	-4019	-4348	-4697	-2899	-4045	4998	-4527	-5102	-4364	-3492	-3638	-4203	4355	3681	-2664	-3902	-4616	-4606	38100%
	-149	-500 -8139	233 -9181	-894	-381	399 -701	106 -1379	-626	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	248	
	-8	-0103	-3101	-034	-1115	-1011	1010			· · · · · · · · ·											
265(N)	-2725	-4778	2906	990	4898	-2485	-1922	-4885	-2320	-4718	-4140	3045	-3069	·1512	•3311	-2334	-2821	-4325	-4919	-3794	38200%
<u>-</u>	-149 -8	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	106 -1378 °	-626 '	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
		0.22																			
265(7)	-2061 -149	-3396 -500	-596 233	903 43	-4071 -381	-2367 399	-1713 106	-3874 -825	-1685 210	-3859 -466	-3103 -720	2125 275	-2650 394	-1369 45	-2277 95	-1897 359	3157	-3351 -369	<b>-4</b> 055 -234	-3271 -249	38300%
<del>-  </del>	-143	-6139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	*020	210	**00]	120	210	324	10	30		118	-303		-241	
									- 1244						(854)	- 7654	(4.4)	- 660	i an al	1000	22.12.27
267(A)	3410 -149	-2035 -500	-3979 233	-4290 43	-4573 -381	659 399	-3798 106	-4400 -626	4332	-4660 -466	-3754 -720	-2978 275	-3080 394	-3858 45	-4099 96	-1690 359	-1908 117	-3194 -369	-4697 -294	-4687 -249	38400%
<u>.                                     </u>	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378					=-		:3							
289/E\	2110	_1/0cl	4026	2054	2025	-2588	1204	-3596	1970	-24 47)	-aeac)	tonel	-2827	1323	.777	-1923	-2032	-3199	-3455	-2917	38500%
268(E)	-2118 -149	-3486 -500	-1036 233	2964 43	-3935 -381	399	-1284 106	-526	1878 210	-3417 -466	-2636 -720	-1209 275	394	45	-773 96	359	117	-369	-294	-2317	00000 K
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378*														
269(Y) [	4524	-3618	-5100	-5310	1910	-4972	-1299	-3522	634	-2951	-2965	-3649	-4847	-3741	4299	-4199	4391)	-3637	2997)	4211	38600%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-359	-294	-249	**************************************
:	-166	-8139	-3345	-894	-1115	-701	-1378														

270(G)	-4176	-3995	-4855	-5222	-5686	3828	-4823	-6386	-5533	-9087	5741	4000	ional	E249)	£470l	1161	acco	EC 42	4764	5000	5070001
214(3)	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-5741 -720	-4896 275	-4606 394	-5312 45	-517B 96	-4461 359	-4560 117	-5613 -369	-4754 -294	-5635 -249	38700%
	-6	-7992	-9034	-894	-1115	422	-1980	-020	<del></del> "	-400	-120	214			301	307	114	-000/	-234	-243	
			*****																	<del></del>	
271(D)	-2710	-4705	3025	1828	-4680	1758	-1932	4863	-2320	-4703	-4115	-1084	-3073	-1621	-3297	·2330	-2809	-4301	4894	-3793	38100%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	_117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378		<u> </u>												
A7000	0107	017/	1000	4407	A1(4	1510	444	Arri	0700	- Anal	4550		4000		A 100	0404	ALLA	42.00		4000	******
272(Y)	-2497 -149	-2175 -500	-4651 233	-4137 43	244T -381	-4046 399	-2215 106	255 -626	-3766 210	892 -466	1559 -720	-3537 275	-3886 394	-3109 45	-346B	-3181 359	-2410 117	-1282	-1615 -294	3508	38909%
	-6	-6139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	-920	. 210	-400	-120	219	324	47	98	233	1111	-369	-24	-249	
	- 4	-0107	-9101	7/24	-1110	-701	-1010														<del></del>
273(V)	-1425	-1250	-3480	-2894	-1283	-3035	-1955	691	-2570	-1	429	-2568	-3060	942	-2514	-2129	1701	2578	-1907	-1553	39000%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-456	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-834	-1115	-701	-1376														
			77.10																		
274(T)	516	-1643	-1918	-1401	-2170	-2112	-1367	-1759	-1234	-2016	-1265	-1442	-2421	-1149	887	1341	2345	822	-2454	-2006	39100%
	-149	-500 -8139	-9181	-894	-361	399	106	-625	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
ــــــــــــــــــــــــــــــــــــــ	-8	-6179	•3/01	-074	-1115	-701	-1378	1													
275(G)	677	-2128	-3838	4171	-4647	3536	-3816	-4506	4340	-4749	-3857	-3009	-3149	-3871	-4137	-1784	-2005	-3297	4725	4735	39200%
	-149	-500	233	43	-391	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	33LVU IG
.	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378				124				- 44			<u> </u>			
276(P)	-992	-2210	343	-359	-2447	-1960	-675	-2143	633	-2204	-1351	-651	2813	-260	-802	465	-939	-873	-2467	1093	39300%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-486	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	-249	
1	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701 <sub>t</sub>	-1378		·												
477/Di	-1214	-2548	4007	4079	475	2145	246	1507	610	4510	ACEN	705	^^^	570	2002	147	4100	94.04	AFTAL	0034	
277(R)	-149	-500	-1097 233	1072	175 -381	-2145 399	-716 106	-2587 -626	848 210	-2528 -466	-1653 -720	-795 275	-2228 394	-273 45	2862 98	417 369	-1133 117	-2191 -369	-2671 -294	-2034 -249	39400%
	-8	-B139	-9161	-B94	-1115	-701	-1376	-070	210	-400	-120	210	234	40	30	309	114	-369	-Z54	-249	
		<u> </u>	- 4144		11.5		1010											<del></del>			
278(V)	289	-2035	-5133	-4789	-2632	-4777	-4639	2142	4689	-1581	-1443	-4511	-4649	-4585	-4784	-4102	-2487	3125	-4202	-3717	39500%
1	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	·1378														
							a			1011											
279(1)	-2265 -149	-1919	-4828	-4452	-2473	-4254	·3954	3155	4265	-1516	-1326	4066	-4279	-4082	-1274	225	-2288	2182	-3688	-3250	39600%
	-149	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 •701	106 -1378	-626	210	-456	-720	275	394	45	96	359	117	-369	294	-249	
		-0109	-9101	-054	1119	-,101	1910														<del></del>
(C)081	-1731	-3162	2329	-550	-3318	-2239	-1273	-3221	-1145	-3214	-2403	2295	-2573	-899	-1742	-1561	1851	-2804	-3366	1327	39706%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	30,33 A
	-8	-8139	-9181	-894	·1115	-701	-13781														
281(E)	1097	-2699	1227	2368	2994	-2011	-796	-2753	381	-2704	-1803	-640	-2190	-358	-992	·1055	-1162	-2310	-2885	1152	39800%
	-149	-500	233	43	-381	339	106	-628	210	-466	-720	276	394	45	96	359	117	-369	-234	-249	
	-8]	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
82(E)	-166	-2372	859	1835	-2692	-1861	1182	-2444	490	-2388	-1462	590	478	1356	-520	116	837	-1994	-2555	-1871	39900%
ve(c)	-149	-500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	23300 /6
-	-8	-8139	-9181	-834	-1115	-701	-1376	- 020	2,10	-4001	-120	119	034	40	30)	- 009	- 111	-303	-234	1243	
			•.•.	243			,519														
93(T)	228	-1688	-3656	-3444	-3179	-2145	-2891	-2611	-3215	-3076	-2328	-2557	-2821	-2916	-3214	2251	2366	1397	-3549	-3270	40000%
	-149	-500	233	43	-381	399	108	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376	'													
84(K)	-2931 -149	-3623 -500	-3848 233	-2331 43	-4472 -381	-3512 399	-1358 106	-3763 -626	2942 210	-3413 -466	1860 -720	-2188 275	-3430 394	-937 45	2705 96	·2874 359	-2650 117	-3556 -369	-3267 -294	-3189 -249	40100%

	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
285(E)	413	-2370)	732	1690	-2691	-1863	-528	-2442	1639	-2385	-1468	-498	-1960	1120	437	106	-836	1992	-2552	-1869	40200%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-465	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-284	-249	10000 11
-	.8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378		·												
286(A)	1871	-2286	-843	814	2570	-1928	-57B	269	1096	-2279	-1391	-5%	-2019	-136	1056	-62	-881	-1389	-2488	-1849	40300%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
$\vdash$ $\vdash$	-6]	-8139	-9181	-834	-1115	-701	-13761		1												
287(M)	-3656	-3159	-5816	-5350	-1349	-5421	-1248	-822	4928	948	4920	-5248	-4838	-4039	-4539	-4860	-3556	-1557	- 3014	-3030	40400%
	-149 -8	-500	233	-894	-381 -1115	399 -701	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	95	359	117	-369	-284	-249	
$\vdash$	-01	-8139	-9181	-034	•1119	-/01	-13/0			<del></del>		<del></del>								<u> </u>	
288(K)	-1646	-2891	-1591	287	-3346	-526	-912	-2971	2631	-2032	-1997	-1146	-2554	472	1762	·1527	-1524	-2587	-2865	1245	40500%
<u> </u>	-149	-500 -8139	233 -9161	-894	-381 -1115	399 -701	106	-626	210	-466	-720	275	394	45]	96	359	117	-369	-294	-249	
	Y_	0100	V1V4				1010)														
289(E)	-172	-2394	367	2205	-2713	487	-545	-2465	·134	-2403	·1486	1305	·1975	663	831	-795	72	-2015	-2577	-1891	40500%
	-149 -8	-500 -8139	233 -9161	-894	-381 -1115	399 -701	106 -1378 '	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-294	-249	
290(C)	1574 -149	-500	-45% 233	-4122 ·	-2155 -381	-3932 399	-3330 106	1746 -626	-3870 210	1406 -456	- <b>110</b> 9	-3691 275	-3957 394	-3613 45	-3805 98	-3144 359	-2046 117	2342 •369	-3118 -294	-2720 -249	40700%
F	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	-020		*400	-120	219	. 394	44	30	333	1331	•305	-239	•243	
													·								
291(L)	-187 -149	-2175 -500	-4307 233	-3889 43	-898 -381	-3779 399	-2344 106	-944 -626	-3485 210	2865 -466	-476 -720	-3390 275	-3782 394	-3025 45	-3298 96	-2972 359	-2345 117	-1269 -369	-1846 , -294	1565 -249	40860%
	-6	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-137B	-020	1	-704	-740	*1A	- V-13					-000	, 7,471	-210	
1902/12	aen	22.42	.449	4044	need	iocel	072	0444	*conl	9256	017	400	10/0	neni	tool	762	707	4000	ocaal	6054	400000
292(K) (	-149	-2347 -500	233	1211 43	-2665 -381	-1855 399	873 106	-2414 -626	1692	-2362 -466	-720	-492 275	-1949 394	889 45	-603 98	-763 359	783	-1968 -369	-2532 -294	-1851 -249	40900%
	-8	-B) 39	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
293(D)	-2148	-3878	2790	1765	4119	-2356	-1511	-3962	-1467	-3852	-3075)	24)	-2782	-1139	2142	-1879	-2163	-3473	4024	-3155	41000%
230(D)	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	294	-249	71000 //
	-8	-8139	-9181	-B94	-1115	-701	-137B1		<u> </u>				<u>.                                    </u>								
294()	-2630	-2131	-5302	-4991	-2/37	-5092	-5106	3464	4941	-1495	1447	-4789	4862	-4869	-5086	-4473	-2627	2071	-4467	-3968	41100%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	294	-249	
لــــــــــــــــــــــــــــــــــــــ	-8	-8139	-9'81	-894	-1115	-701	-1378							<u>-</u>			<del></del> -		<del></del>		<del></del> .
295(Q)	346	-3134	-1818	-1401	-3862	-2760	-1314	-3433	1329	-3271	-2513	-1545	-2936	3817	-430 96	-2018	-2031	-3060	-3278	-2903	41200%
-	-149	-500	233	43	-381	399	105	-628	210	-486	-720	275	394	45	98	359	117	-389	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	]	<u>`</u>												<del></del>
296(S)	-1354	-2895	1712	354	-3192	-2068	-914	-2967	·621	-2903	-2012	1817	-2288	724	-1177	1978	-96	-2509	-3076	-2340	41300%
	-149	-500	233	43	-381	399 -701	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	294	-249	
	-8	-8139	-9181	-694	-1115	-/01	-1378	!								·	<del></del>				
297(G)	4435	-4203	-5092	-5462	-5693	3834	-5028	-6627	-5765	-6297	-5970	-5141	-4804	-5546	-5385	-4727	-4815	-5862	4924	-5849	41410%
	-149 -8	·500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	105 -1376 °	·626	210	-466	-720	275	394	45	38	359	117	-369	-294	-249	
		-01001	-0101	-024	-1119		-rajuj														
298(E)	-137	-2374	-769	2013	-2697	-1895	-552	-2438	623	-2389	-1472	-536	-1991	-97	717	829	1488	-1999	-2559	-1890	41500%
<del>:</del> -	-149 -8	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
		-9103	-9181	457	1114	7011	1010														

299(F)	4317	-3577	-4619	543	3859	-4820	-1320	-3438	<b>√609</b>	-2900)	-2894	-3532	4750	-3628)	-4203	-4078	-4237	-3546	-601)	2917	41600%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	41000%
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378										,,,,				
300(A)	2827	-1603	-4068	-3628	-2047	-3165	-2823	1205	-3349	-1486	-1083	-3103	-3432	-3073	-3298	·2387	197	1100	-2812	-2147	41700%
·	-149	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	106 -1378	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-6135	-9161	-634	-1115	-101	-13/0									<del></del>					
301(K)	2364	-3363	-2464	163	-4038	-3041	-1188	-3501	2928	-3234	-2487	-1693	-3047	-758	2488	-458	-2152	-3194	-3159	-2895	41800%
•	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	110107
	-8	-8139	-9161	-894	-1115	-701	-1376*														
302(N)	-893	-2361	740	1780	-2580	-537	-524	-2429	930	-2376	1895	-498	-1958	-66	722	775	-833	-1982	-2545	-1864	41900%
•	-149 -8	-500 -8139	233 -9181	43	-381	399 -701	106 -1378	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	1 -0	10103	-3  0	-894	-1115	·ruŋ	1310														
303(W)	-2965	-2553	-4795	-4462	3045	-4315	-1779	-1426	-4093	. 92	-997	-3564	-4179	-3330	-3743	-3175	-2878	664	4754	-84	42000%
. ``	-149	-500	233	43	-381	399	106	-826	210	466	720	275	394	45	96	359	117	-359	-294	-249	
•	8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378				·····										
304(I)	-2621	-2136	-5246	-4859	-2364	-4987	-4577	3052	4747	•250	1043	4641	4713	-4488	4769	-4301	-2597	2384	-3934	-3596	42100%
•	-149 -8	-500 -8139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-365	-294	-249	
		-01004	-VIOIL	-wal	-11114	-IAIL	10101		1										<del></del>		
305(L)	684	-1319	-1741	· 761	-1375	-2223	-1037	-927	-1042	1693	-533	-1287	-2325	-915	-1349	767	·152	B4	-1756	-1329	42200%
	-149	500	233	43	-381	399	106	-526	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376	ľ													
													21.20								
306(E)	364	4165	621	3314	4393	-2398	·1686	4282	-1836	-4169	-3446	729	-2893	-1339	-2626	2045	-2402	-3767	4362	-3401	42300%
	-149 -8	-500 -6139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	106 -1378 °	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	- 70	*0100	-3 01	-024	-1110	-101]	-1010		1	<del></del>											
307(14	-939	979	-1235	-881	-1738	1352	935	-1357	-549	-1572	-816	2186	-2155	-482	165)	·1022	-880	30	-1990	1446	42400%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	456	-720	275	394	45	96	359	117	369	-294	-249	
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
															···						
308(Q)	-149	-2393 -500	-773 233	511 43	-2721 -381	-316 399	-544 106	-2465 -626	1211 210	-2405 -466	-1484 -720	584 275	-1989 394	2135 45	1528 96	-812 359	-868 117	-2019	-2558 -294	-1895	42500%
	-149	-8139	-9181	-394	-1115	701	1378	-020	210	-400	-120	2/4	374	40	30	333	111	-369	-234	-249	
<del>, , ,</del>	<u> </u>	0104	- VIOIL	747	17,14	-1017	1919	<del></del>													
309(A)	2050	-1857	-1091	-526	-2013	-2012	188	-1645	-385	-1213	-1011	486	-2103	-346	1657	-963	306	-261	-2169	-1624	42800%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-6	-8139	-9161	-694	-1115	-701	-1378														
24000	1010	ALC D	2000	2000	4000	0064	- APRIL	3/65	0004	1000	3017	A1151	2407	10130	2401	Lond	04.00	1000	5044	40741	1078001
310(G)	-1848 -149	-2469 -500	-2089	-2292	1262	2914	-2358	-3663 -626	-2904 210	-3628 -466	-3017 -720	2347 275	-3167 394	-2550 45	-3185 96	-1996 359	-2162 117	-3006 -369	-2814 -284	-1874 -249	42700%
	-195	-6139	233 -9181	-894	-381 -1115	399 -701	106 -1376 <sup>4</sup>	-020	210	*999	-120	210	324	40	20	303	1111	.000	·641	-243	
	<u>~</u> _	- V.V.	- 101	V.,			-10101														
311(1)	475	1019	-1606	-1042	225	-2192	-935	-946	-891	-1226	1222	357	-2267	1002	1577	-1172	-868	800	-1730	2446	42800%
	-149	·500	233	43	-381	339	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-234	-249	-
	-8	-8139	-9181	-894	·1115	-701	-1378	$-\mathrm{T}$													
(A/FC -	. A-91	AOTAL	- Janal		0-00	Annal	Aparl	\$14F	1000	17.40	IS AFA	(Feel	nced	10	annal	4255	and .	0000	0000	2074	1002001
112(P)	-87 -149	-2372	-1362	756	-3738	-2205	-2007 106	-3445 -526	-1924	-3675 466	-2761 -720	-1555	3599	-1697	-2362	-1566 359	286 117	-2903	-3832 -294	-3277	42900%
	-2336	-500 -8139	233 -325	-894	-381 -1115	399 -701	-1378	-920	210	700	-120	275	194	45	96	100	111	-369	-234	-249	
1	-2000	7100	-3231	-004	-1110	-101	-1010														
13(K)	-804	-1483	-564	-230	1920	-1335	-101	-1605	2889	-1630	-1021	-349	-1569	232	698	-786	-769	-1358	-1637	-1317	43000%
	-149	-500	233	43	-361	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	

	-38	-5840	-6882	-894	-1115	-3098	-173														
314(E)	-766	-1695	521	2831	-2050	-1029	-293	-1804	-118	-1919	-1331	8	-1441	4	-527	-653	-814	-1512	-1988	-1505	43100%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-62€	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-234	-249	2,115,00
<u>.                                    </u>	-38	-5840	-5882	-894	-1115	-109	-3775														
315(T)	-942	-2382	-739	1086	-2714	151	-581	-2459	-171	-2415	-1499	414	-2004	-128	839	1365	1730	-2017	-2592	-1915	43200%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	-249	
	8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378		1												
316(M)	-2196	-1920	-4499	-3891	1726	-3822	-2504	-645	-3523	1973	3030	-3442	-3673	-2938	-1257	-2944	-2114	326	-2014	1662	43300%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-628	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	249	
·	-8	-8139	-9161	-694	-1115	-701	-1376			<u> </u>											
317(H)	-883	-2314	-747	517	-2618	-1863	1714	647	1272	-2322	-1408	1011	472	-69	433	-772	1411	-289	-2507	-1836	43400%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	433 96	369	117	-369	-294	-249	
	િક	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378	1,	]												
318(A)	2474	-2397	-816	-367	-2797	-273	-722	-2529	555	-2507	-1610	592	-2110	837	-805	-13B	-1805	-2092	-2699	-2039	43500%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	294	-249	
	-8	-8139)	-9181	-894	-1115	-701	-1378]*		1												
319( <b>M</b> )	154	-986	-2485	-337	1024	-375	-1232	325	414	867	1235	-1752	-2474	-1419	1020	-1455	670	-411	831	535	43600%
* 14(14)	149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	455	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	7000071
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376*														·
320(R)	-1311	-2432	-1349	-724	-2724	-2272	-799	-2361	613	-644	1079	976	597)	-392	2908	-1246	-1219	-2044	-2579	-2061	43700%
VZOQI Y	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-234	-249	4910010
-	-6	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														
321(F)	897	-2364	-833	905	-2678	-1930	-568	-2405	1293	-2366	1465	-575	-2020	-117	2045	95	-893	-1984	-2543	-1892	43800%
-	-149	-500	233	43	-381	399	106	626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	3000031
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1376														
322(N)	505	-2300	-750	523	2598	121	-525	-594	486	95	-1396	1720	-1957	348	224	551	-821	-1910	-2497	-1828	43900%
022(19)	-149	-2300	233	.43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	10007
	-8	-8139	-91B1	-B94	-1115	-701	-1378	•													
323(E)	444	-2266	-766	1488	-2551	-1871	-533	-2276	889	-2266	1474	1476	1963	682	629	-781	12	-279	2472	476	44000%
120(0)	-149	-500	233	43	-381	399	106	626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	294	-249	11000 8
	-6	-8139	-9161	-834	-1115	-701	-1376 '	•													
MALO	3214	1770	770	ansi	1000	4704	- 1661	600	601	444	-1133	1769	-1627	1398	447	-748	746	-1713	-1779	-1595	44100%
324(N)	1611	-1770 -500	-728 233	-204 43	-2244 -381	-1781 399	426 106	282 -626	210	-2121 -466	-720	275	394	45	95	359	117	-369	-294	249	441007
	-8	-B139	-9181	-894	-1115	-701	-1378														·
225:11	1052	2100	ATEN	1735	3404	2642	(07.1)	2404	048	1494	-2264	2158	-2417	-657	-1430	-1361	197	-2727	-3303	-2540	44200%
325(N)	1053 -149	-3109 -500	1756 233	43	381	-2t43 399	-1074 106	-3191 -626	-845 210	-3124 -466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	-249	********
•	-8	-8139	-9181	894	-1115	-701	-13761														
20743	AOP (	202/	404el	Ancel	2000	0.20	1741	9641	tocal	7500	2017	4170	ancal	4300	4003	875	0(22)	1464	1940	-2601	44308%
326(H)	-2054 -149	-3071 -500	-1245 233	-1267 43	-3252 -381	-2570 399	4711 106	-3611 -625	-1060 210	-3528 -466	·2812	-1479 275	-2961 394	1288 45	-1287 96	670 359	2133	-3161 -369	-3310 -294	-249	W ORKER
	-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	·1376°				-اتتنب. - خــــــ										
107(0)	901	Mail	-	614	AFAF	710	10.91	7545	141	494	(461)	£40)	404	2024	P I	705	610	Er al	24021	1020	444600
327(Q)	-891 -149	-2294 -500	332 233	948 43	-2585 -381	-739 399	-537 106	-2316 -626	-131 210	-138 -466	-1391 -720	-518 275	1404 394	2021 45	-634 96	-785 359	619 117	-561 -369	-2495 -284	-1830 -249	44400%
		-8139	-9191	-894	-1115	-701	-137B	1		TVV	124	-14			- 44	244					
				_التيب																	

	328(1)	-1632	-1661	-2846	-86	-1626	-2983	-1963	3240	-1327	-191	729	-2160	2010	1616	000	7007	1500	(00)	Adres	4557	<del></del>
14   18   18   18   18   18   18   18												-722 -720		-3016 194	-1615 45	96	-2097 359	-1556 117	-660	-2157	-1805	44500%
146  650   220   431   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335					-834							i i v				30	200	11/	-903[	-624	-293	
146  650   220   431   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335   335																						
2528   4510   252   453   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   4718   47	323(F)				3593					-2175												44500%
1869	<u></u>				- 40 - 801		388		-020	210	-455	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
149   550   233   44   38   82   106   458   20   468   70   770   770   584   48   30   30   11   48   30	<b></b> -	7,000	0100	-020	10.74	1110	-101	•10/0														
1.15	330(VI)		-1265	-2058	-1964	479	-1810	-483	-1181	-1470	-968	-802	-1648	-2104	-1454	-1405	-1757)	-1693	-1218	5462	838	44700%
1-90   5949   6862   6864   7196   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176   7176							399	106		210	-466	-720	275					117		-294	249	7117770
148   400   200   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400	<u> </u>	-38	-5840	-6862	-894	-1116	-109	-3775														
148   400   200   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400   400	33100	R	-2087	ons	437	.2276	1044	264	107	2024	9021	4400	cocl	0000	1100	700	- N.1	AFN	4007	4441	4268	
36   4138   4198   4584   1115   770   1738   1												-1109	275			-/09 aci		-353	1337	-2323		44800%
333(9)   2446   251(2)   5850   4109   3528   4872   4489   4538   4539   4480   4538   4630   4630   4648   4650   3980   1117   320   220   220   2480   3280   220   220   2480   3280   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   220   22		-8			-694				- YAY	19	101	-110	210			301	333	- 1111	-303	-234	*240	
1486   5-90   223   48   3-30   299   146   475   210   486   720   218   8-94   68   80   159   111   3-85   2-94   4-85     1415   1420   2000   545   4888   3234   5268   457   5476   5476   5476   4894   448   489   448   489   448   489   448     1415   1420   488   489   489   489   489   489   489   489   489   489   489   489   489   489     1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416   1416																						
1-4   8136   2181   4864   1182   700   1376   1   1   1   1   1   1   1   1   1	332(V)						-4682			4580	-1533	-1402	-4414		-4456	-4663		1117	3227	4065	-3597	44900%
330    445    420    486    486    320    486    487    558    827    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486    486	<u> </u>								-525	210	-496	-720	275	394	45	96	369	117	-369	-234	-249	
- 1-1-18   -596   239   -488   -389   889   155   \ \( \sqrt{1.576} \) \( \sqrt{1.576} \) \ \( \sqrt{1.576} \) \\( \sqrt{1.576} \) \( \sqrt{1.576} \) \\(		.0)	-0103	-2101	-631	-1115	-101	-13/0	4													<del></del>
- 1-1-18   -596   239   -488   -389   889   155   \ \( \sqrt{1.576} \) \( \sqrt{1.576} \) \ \( \sqrt{1.576} \) \\( \sqrt{1.576} \) \( \sqrt{1.576} \) \\(	333(G)	-4435	4203	-5092	-5462	-5893	3834	-5028	-66271	-5765	-6297	-5970	-5141	4804	-5546	-5385	-4797	4915	5000	4994	-seag	4500002
Section   Sect		-149	-500	233	43	-381	399			210	466		275	394	45	96	359	117	-369		-249	N GUIDE
149   -500   223   43   -328   339   166   626   216   466   720   217   324   45   56   359   111   358   224   345	•	-8	-8139	-9181	-894	1115	-701	-1378														
149   -500   223   43   -328   339   166   626   216   466   720   217   324   45   56   359   111   358   224   345	00100	1199	67.01	70.0		-444	444	401	***													
-6	134(E)					-3114	-2113			445		-1912										45100%
									.020	210	-406	-120	219	324	40[	36	2034	111	-309	-239	-243	
			4,00	4.144				1010														<del></del>
	335(K)				1309		-2086			2626	-2637		-718		1198					-2770	-2133	45200%
336(1)   347    3622   5884   5375   5327   5884   4389   632   5432   5438   2862   1871   5558   4862   4044   4669   4863   3438   742   3692   3239   453072	أست						399		-626	210	-466	-720	276	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
		-8	-8139	-9181	-894	-1119	-701	·1378[`		1	<u>-</u>								<del></del>			
	336(1.)	3671	-3023	-5064	-5375	-1321	-5646	-1390	-630	-5138	2062	1671	-5358	4852	4044	4699	.4963	-2436	742)	-3092	-3239	ASTONAL
18																		117			-249	44900 /6
							-701															
	337(R)												4521								4993	45400%
389(E)   943    -2422   1002    1200   2744    377    -572    -2483    962    -2438    -1617    -522    -1998    -117    -581    1128    -534    -2014    -2608    -1921    4550074    -148    -500    233    43    -381    339    106    -626    210    -466    -770    273    334    45    96    358    117    -368    -224    -248    -488    -3273    771    -3038    -224    -248    -488    -3273    771    -3038    -237    -248    -488    -3273    771    -3038    -237    -248    -488    -3273    771    -3038    -237    -248    -488    -3273    771    -3038    -237    -248    -488    -3273    771    -3038    -238    -238    -458    -488    -3273    771    -3038    -238    -238    -488    -488    -3273    771    -3038    -238    -238    -238    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -288    -228    -248    -288    -3273    -288    -288    -3273    -288    -288    -3273    -288    -288    -3273    -288    -288    -3273    -288    -288    -328    -288    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388    -388	<del></del> -								-626	210	400	-(24)	2/5	394	45	98	359	11/1	-369	-254)	-249	
- 148		- 4	.0103	-7104	-044	-1110	4707	*1010			<del></del>									<del></del>		<del></del>
- 148	338(E)	913	-2422		1200	-2741		-572	2493	982	-2439	-1517	-522	-1998	-117	681	1129	-534	-2044	-2609	-1921	45500%
339(M) -3391 -2886 -5774 -5282 -1338 -5407 -4210 -576 -4943 1721 4388 -5109 -4742 -3963 -4548 -4689 -3273 771 -3008 -3137 45500% -149 -500 233 43 -381 399 106 -626 210 -466 -720 216 394 45 96 368 117 -369 -224 -249 -140 -140 -140 -140 -140 -140 -140 -140									-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
148  -500  233  43  -381  399  106  -626  210  -466  -720  276  394  45  96  368  117  -385  -224  -249    -8  -5135  -918  -894  -1115  -701  -1378    -8  -258  441  4380  -2931  -3334  -2655  641  -2503  -1740  449  -1534  -1667  457007    -143  -500  253  43  -381  899  106  626  210  -466  -720  275  384  45  96  369  117  -369  -294  -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249		-8	-8139	-9181	-894	-1115	-701	-1379		1												
148  -500  233  43  -381  399  106  -626  210  -466  -720  276  394  45  96  368  117  -385  -224  -249    -8  -5135  -918  -894  -1115  -701  -1378    -8  -258  441  4380  -2931  -3334  -2655  641  -2503  -1740  449  -1534  -1667  457007    -143  -500  253  43  -381  899  106  626  210  -466  -720  275  384  45  96  369  117  -369  -294  -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249    -249	130/10/	-3304	-29961	-577/	_5202	_1118	-54071	-4241)	-576	JOAN	4701	1100	-5100	4749	.3063	ASAD!	.4590	2072	771	-3009	-3177	(VOODSA)
1-8  -9  -9  -9  -9  -9  -9  -9  -1  -1  -70  -1  -1  -70  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -1  -7  -1  -7  -1  -7  -1  -7  -7  -7  -7  -7  -7  -7  -7  -7  -7	10.2(11)									210												4000074
1812   -1601   -3837   -3475   688   -3401   -2222   516   -2583   441   -4380   -2931   -3334   -2559   641   -2503   -1740   404   -1834   -1651   -4570076   -149   -500   233   -43   -3351   -339   105   -626   210   -466   -720   275   -384   -45   -96   -359   117   -369   -224   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -249   -			-8139	-9181			-701															
-149 -500 233 43 -381 399 106 426 210 466 -720 275 384 45 96 359 117 -369 -294 -249																						
-8 -8135 -5181 -658] -1116 -701 -1376 1 -41(F) 102 -1763 -1723 -1312 426 -2112 -1410 -2021 -1236 -2235 -1470 -1394 3205 693 -1607 703 -1207 -1700 -2313 -2127 458007/2 -149 -500 233 48 -381 359 106 -626 210 -466 -720 278 334 45 96 359 117 -355 -234 -249 -255 -6139 -2637 -894 -1118 -701 -1378 1 -4208 -3022 4312 -4121 1891 -4228 -1173 -2749 310 -2369 -2250 -3447 -4208 -2971 -3009 -3494 -3396 -2816 5544 611 458007/2	140(11)																					45700%
141(F)									-626	210	.466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	294	-249	
149   -500   223   48   -381   399   101   -626   210   -466   -720   274   334   45   96   359   117   -359   -294   -249     -259   -0139   -2637   -693   -1112   -701   -1376		- 4	-8135	-9161	-894	-1110	-(01)	-13/8									<del></del>					
149   -500   223   48   -381   399   101   -626   210   -466   -720   274   334   45   96   359   117   -359   -294   -249     -259   -0139   -2637   -693   -1112   -701   -1376	41(P)	102	-1789	-1729	-1313	428	-2112	-14161	-2021	1236	2235	-1470)	-1394	3205	695	-1607	703	-12071	-1700	-2313	-2121	45809%
-255 -0135 -2637 -891 -1115 -701 -1376 : 142(W) 3486 -3022 4312 -4121 1891 -4228 -1173 -2749 310 -2369 -2250 -3847 -4208 -2971 -3009 -3494 -3396 -2016 5544 611 44000%							399															
12(W) 3486 -3022 4312 4124 1694 -4228 -1173 -2749 310 -2369 -2350 -3147 4208 -2971 -3005 -3484 -3396 -2018 5544 611 43007					-894				1													
						1000	10.00										A 1000		44.4			
143	(42(W)																·3484					45800%
		-1\$9	•300	255	43	-387	399	100	-620	210	-400	-(20)	2/0	394	45	95	359	11/	103	-294	-243	

	239	-7889	-2749	-894	-1115	·1590)	-583		,												
						1030	1000														
343(1)	-2220	-1737	-4660	4531	-2271	-4617	-4497	3348	-4448	-1059	-1008	4311	-4407	-4340	4559	-3974	-2216	2150	3915	3445	46000%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	36	359	117	-369	-294	-249	70007
	-114	-7660	-3820	-894	-1115	-1149	-865		ī												
344(A)	1693	2010	E77	22	accel	ccal	421	6204	- 1010	- 4000	43.00		- 454A			- 485					
- Unjeer	-149	-2218 -500	532 233	-33 43	-2555 -381	-653 399	413	-2304	1212	-2260	-1348	582 275	-1822	37	-536	965	-724	-1859	-2439	-1755	46100%
<del></del> -	-10	-7753	-8795	-894	-1115	-897	106 -1111	-626	210	-466	-720	2/5	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-14	11/4	-0130	-024	-1114	-02/	-1111		{												
345(A)	1523	-2068	-769	-231	2383	1040	-522	-2094	\$26	-2120	-1245	-\$17	-1922	1335	-611	251	-768	-123	-2361	-1732	45200%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	249	1,1,1,1,1
	-9	-7949)	-8991	-894	-1115	-1432	-668														
346(N)	-1650	-3264	1760	-348	-3555	-230	-1131	-3362	324	-3285	-2448	2847	1624	-733	1607	4420	APAE	6007	1491	· Annal	4chand)
	-119	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	-1607 98	-1438 359	-1645 117	-2687 -369	-3466 -294	-2662 -249	46300%
	-193	-7842	-3049	-894	-1115	-1432	-668	-920	219	704	-120	214	- 047	70]		303	114	+303	•274	-243	
34766)	150	2932	-2433	-1483	-3710	-2747	-907	-3141	3369	-2897	-2178	-1487	-2774	488	1175	-1994	-1888	-2848	-2822	-2610	45400%
	-149	-590	233	43	-381	399	106	-626	210	466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
<u> </u>	-11	-7660	-8702	-894	-1115	-1824	-479														
348(L)	-740	-922	-1768	154	-921	-2070	-829	1384	247	1472	-100	-1202	-2134	-805	4CE	-1085	677	(38)	4446	010	(arrand
oro(L)	149	500	233	43	-381	399	105	-626	210	-466	-720	275	394	45	485 96	359	-677 117	471 -369	-1340 -294	-944 -249	46500%
•	-11	-7660	-8702	-894	-1115	-943	-1069	- 020	- 210	700	-160[	210	301		301	333	1111	•303	-2341	ZN	
																				11.	
349(V)	. 138	-1046	-3186	-2599	-1089	-2803	-1711	589	645	945	-236	-2305	2830	-2012	-2236	-1892	-1154	2537	-1701	-1344	46800%
	-149	-600	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
••	-9	-7842	-88%	-894	-1115	-380	-2109		<u> </u>									:			
350 <b>(D)</b>	-2086	-3722	2888	1158	-4001	1601	-1510	-3811	-1573	-3773	-3018	-904	-2733	-1154	2294	-1833	-2125	575	-3993	-3117	45700%
	-149	-500	233	41	-381	399	106	-626	210	-465	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-234	-243	40100 10
	-8	-8045	-9088	-894	-1115	-701	-137B	_	<del></del>												
351 <u>(V</u>	-78	-2308	398	-137	-2626	-463	542	-2374	244	-2323	-1400	-447	531	720	162	-724	290	-1929	-2493	-1812	46800%
•	149	-5(0)	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	275	394	45	98	359	117	-369	-294	-249	
	-8	-8046	-9088	-894	-1115	-701	-1378	ــــــــــــــــــــــــــــــــــــــ													
352(D)	898	-1911	1684	-335	-2089	1692	-573	-1746	489	-144	811	-609	34	-182	-708	541	-74	-281	-2188	-1605	46900%
	-149	-500	233	43	-381	399	106	-626	210	-466	-720	276	334	45	96	359	117	-369	234	-249	
	-10	-7746	-8797	-894	-1115	-701	-1378														
	ional				444		444														
353(K)	1676	-2544 -500	-1956 233	-1135	-2823	-2631 399	-800 106	-2469 -626	2955 210	-2426	-1563	-1240	-2548	-407	1469	-1628	-1517	-119	-2497	1519	47000%
	-11	-7649	-8691	-894	-1115	-701	-137B)*	+010	210	-466	-720	275	394	45	96	359	117	-369	-294	-249	
	-11	1045	-0031	1034	-1110	701	-1016	1						<del></del>			<del></del>				
54(N)	-1074	-1925	1092	-1190	-3523	-1781	-1760	-3345	-1701	-3432	-2589	3429	1327	-1460	-2119	1162	-1362	-2558	-3601	-3846	47100%
•	1			١	,	,				ī	- 1	,	ī	′	•	_ '	· ·		F		
	2 2		1	1	7	1	,		0												

También se describe en el presente documento el objeto de las reivindicaciones de la solicitud internacional tal como fue presentada:

- 1. Una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante que comprende la secuencia de aminoácido como se expone en la ID de SEC Nº: 29.
  - 2. Una molécula de ácido nucleico que codifica la enzima cetil-ácido reductoisomerasa mutante de la reivindicación
  - 3. Una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante que tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en la ID de SEC Nº: 23.
- 4. Una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante codificada por la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3.
  - 5. Una célula recombinante que comprende la enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante de la reivindicación 1.
  - 6. Una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante como se expone en la ID de SEC Nº.: 17 que comprende al menos una mutación en un resto seleccionado del grupo consistente en 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170.
  - 7. Una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante de acuerdo con la reivindicación 6, en la que:

15

- a) el resto en la posición 47 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, F, G, I, L, N, P e Y;
- b) el resto en la posición 50 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, M, N, V y W;
- 5 c) el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, G, H, N, y S;
  - d) el resto en la posición 53 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, H, I, W:
  - e) el resto en la posición 156 tiene una sustitución de aminoácidos de V;
- 10 f) el resto en la posición 165 tiene una sustitución de aminoácidos de M;
  - g) el resto en la posición 61 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
  - h) el resto en la posición 170 tiene una sustitución de aminoácidos de A;
  - i) el resto en la posición 24 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
  - j) el resto en la posición 33 tiene una sustitución de aminoácidos de L;
- 15 k) el resto en la posición 80 tiene una sustitución de aminoácidos de I; y
  - I) el resto en la posición 115 tiene una sustitución de aminoácidos de L.
  - 8. Una molécula de ácido nucleico que codifica la enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante de la reivindicación 6.
- 9. Un procedimiento para la evolución para la evolución de una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que une NADPH a una forma que utiliza NADH que comprende:
  - a) proporcionar una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que utiliza NADPH que tiene una secuencia de aminoácidos nativa específica;
  - b) identificar los restos de conmutación del cofactor en la enzima de a) basado en la secuencia de aminoácidos de la enzima cetol-ácido reductoisomerasa Pseudomonas fluorescens como se expone en la ID de SEC Nº: 17 en la que los restos de conmutación del cofactor están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 24, 33, 47, 50, 52, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170;
    - c) crear mutaciones en al menos uno de los restos de conmutación del cofactor de b) para crear una enzima mutante en la que dicha enzima mutante ligue NADH.
    - 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que:

25

- 30 a) el resto en la posición 47 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, F, G, I, L, N, P e Y;
  - b) el resto en la posición 50 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, M, N, V y W;
- c) el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, 35 G, H, N, y S;
  - d) el resto en la posición 53 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, H, I, W;
  - e) el resto en la posición 156 tiene una sustitución de aminoácidos de V;
  - f) el resto en la posición 165 tiene una sustitución de aminoácidos de M;
- 40 g) el resto en la posición 61 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
  - h) el resto en la posición 170 tiene una sustitución de aminoácidos de A;
  - i) el resto en la posición 24 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
  - j) el resto en la posición 33 tiene una sustitución de aminoácidos de L;

- k) el resto en la posición 80 tiene una sustitución de aminoácidos de I; y
- I) el resto en la posición 115 tiene una sustitución de aminoácidos de L.
- 11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la enzima cetol-ácido reductoisomerasa tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en la ID de SEC №: 29.
- 5 12. Un procedimiento para la producción de isobutanol, que comprende:
  - a) proporcionar una célula anfitriona microbiana recombinante que comprende las siguientes constructos genéticos:
    - i) al menos un constructo genético que codifica una enzima acetolactato sintasa para la transformación de piruvato en acetolactato;
- ii) al menos un constructo genético que codifica una enzima cetol-ácido reductoisomerasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
  - iii) al menos un constructo genético que codifica una acetohidroxiácido deshidratasa para la transformación de 2,3-dihidroxi-isovalerato en  $\alpha$ -ceto-isovalerato (ruta de la etapa c);
  - iv) al menos un constructo genético que codifica una cetoácido descarboxilasa de de cadena ramificada, para la transformación de  $\alpha$ -cetoisovalerato en isobutiraldehido (ruta de la etapa d);
- v) al menos un constructo genético que codifica una alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada para la transformación de isobutiraldehido a isobutanol (ruta de la etapa e); y
  - b) cultivar la célula anfitriona de a) en condiciones donde se produce iso-butanol.
  - 13. Un procedimiento para la evolución e identificación de una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que une NADPH a una forma que utiliza NADH que comprende:
- 20 a) proporcionar una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que utiliza NADPH que tiene una secuencia de aminoácidos nativa específica;
  - b) identificar los restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos nativa cuyas cadenas laterales están en cercana proximidad a la adenosil 2'-fosfato de NADPH como objetivos de mutagénesis;
- c) crear una biblioteca de enzimas cetol-ácido reductoisomerasa mutantes a partir de la enzima cetol-ácido reductoisomerasa de clase I de la etapa a), que tienen al menos una mutación en al menos uno de los sitios objetivos de mutagénesis de la etapa (b); y
  - d) cribar la biblioteca de enzimas cetol-ácido reductoisomerasa mutantes de la etapa c) para identificar enzimas cetol-ácido reductoisomerasa mutantes que unen NADH.
- 14. Una enzima cetol-ácido reductoisomerasa mutante que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la ID de SEC Nº: 19, 24, 25, 26, 27, 28, 67, 68, 69, and 70.

#### **LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> E. I. du Pont de Nemours and Company
- <120> Cetol-ácido reductoisomerasa que une NADH
- <130> CL4165
- 35 <140> CL4165
  - <141> 13-12-2007
  - <160> 70
  - <170> PatentIn versión 3.5
  - <210> <sup>-</sup>
- 40 <211> 30
  - <212> ADN
  - <213> Cebador inverso para el vector pBAD
  - <400> 1

tgatgaacat cttcgcgtat tcgccgtcct

	<210> <211> <212> <213>	68 ADN	
5	<220> <223>	Cebador directo de biblioteca G	
10		característica_nueva (24)(25) n es a, c, g, o t	
		característica_nueva (33)(34) n es a, c, g, o t	
15		característica_nueva (39)(40) n es a, c, g, o t	
	<400>	2	
	gcgta	gacgt gactgttggc ctgnntaaag gcnnggctnn ctgggccaag gctgaagccc	60
20	acggc	ttg	68
	<210> <211> <212> <213>		
25	<220> <223>	Cebador directo de biblioteca E	
30		característica_nueva (24)(25) n es a, c, g, o t	
	<400>	3	
	gcgta	gacgt gactgttggc ctgnntaaag gctcggctac cgttgccaag gctgaagccc	60
	acggc	ttg	68
35	<210> <211> <212> <213>	68 ADN	
	<220> <223>	Cebador directo de biblioteca F	
40	<222>	característica_nueva (33)(34) n es a, c, g, o t	
	<400>	4	
	gcgta	gacgt gactgttggc ctgcgtaaag gcnntgctac cgttgccaag gctgaagccc	60
	acggc	ttg	68
45	<210> <211>		

		ADN secuencia artificial					
	<220> <223>	Cebador directo de biblioteca G					
5	<220> <221> <222> <223>	característica_nueva (39)(40) n es a, c, g, o t					
	<400>	5					
	gcgta	gacgt gactgttggc ctgcgtaaag g	ctcggctnn	tgttgccaag	gctgaagcc	3	60
10	acggc	ttg					68
	<210> <211> <212> <213>	68					
15	<220> <223>	Cebador directo de biblioteca H					
20	<220> <221> <222> <223>	característica_nueva (24)(25) n es a, c, g, o t					
	<220> <221> <222> <223>	característica_nueva (33)(34) n es a, c, g, o t					
25	<220> <221> <222> <223>	(39)(40) n es a, c, g, o t					
	<400>	o gacgt gactgttggc ctgnntaaag g	cnntactnn	tottoccaao	gctgaagcc	2	60
30	acggc		J	-999	,,,,		68
	<210><211><211><212><213>	20					
35	<220> <223>	Cebador de secuenciación (directo)					
	<400>	7					
	aagatta	gcg gatcctacct	20				
40	<210> <211> <212> <213>	20					
	<220> <223>	Cebador de secuenciación (inverso)					
45		8					
	aacagc	caag cttttagttc	20				

<210> 9 <211> 330 <212> PRT <213> Methanococcus maripaludis

5 <400> 9

Met Lys Val Phe Tyr Asp Ser Asp Phe Lys Leu Asp Ala Leu Lys Glu  $1 \hspace{1.5cm} 5 \hspace{1.5cm} 10 \hspace{1.5cm} 15$ 

Lys Thr Ile Ala Val Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly Arg Ala Gln Ser 20 25 30

Leu Asn Met Lys Asp Ser Gly Leu Asn Val Val Val Gly Leu Arg Lys 35 40 45

Asn Gly Ala Ser Trp Glu Asn Ala Lys Ala Asp Gly His Asn Val Met

	50					55					60				
Thr 65	Ile	Glu	Glu	Ala	Ala 70	Glu	Lys	Ala	Asp	Ile 75	Ile	His	Ile	Leu	Ile 80
Pro	Asp	Glu	Leu	Gln 85	Ala	Glu	Val	Tyr	Glu 90	Ser	Gln	Ile	Lys	Pro 95	Tyr
Leu	Lys	Glu	Gly 100	Lys	Thr	Leu	Ser	Phe 105	Ser	His	Gly	Phe	Asn 110	Ile	His
Tyr	Gly	Phe 115	Ile	Val	Pro	Pro	Lys 120	Gly	Val	Asn	Val	Val 125	Leu	Val	Ala
Pro	Lys 130	Ser	Pro	Gly	Lys	Met 135	Val	Arg	Arg	Thr	Tyr 140	Glu	Glu	Gly	Phe
Gly 145	Val	Pro	Gly	Leu	Ile 150	Cys	Ile	Glu	Ile	Asp 155	Ala	Thr	Asn	Asn	Ala 160
Phe	Asp	Ile	Val	Ser 165	Ala	Met	Ala	Lys	Gly 170	Ile	Gly	Leu	Ser	Arg 175	Ala
Gly	Val	Ile	Gln 180	Thr	Thr	Phe	Lys	Glu 185	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Val	Thr	Glu	Leu 205	Ile	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Thr	Cys	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Ile	Tyr	Gln 240
Lys	Gly	Phe	Lys	Asn 245	Met	Trp	Asn	Asp	<b>Val</b> 250	Ser	Asn	Thr	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Gly	Leu	Thr 260	Arg	Arg	Ser	Arg	Ile 265	Val	Thr	Ala	Asp	Ser 270	Lys	Ala
Ala	Met	Lys 275	Glu	Ile	Leu	Lys	Glu 280	Ile	Gln	Asp	Gly	<b>Arg</b> 285	Phe	Thr	Lys
Glu	Phe 290	Val	Leu	Glu	Lys	Gln 295	Val	Asn	His	Ala	His 300	Leu	Lys	Ala	Met

315

Arg Arg Ile Glu Gly Asp Leu Gln Ile Glu Glu Val Gly Ala Lys Leu

310

305

Arg Lys Met Cys Gly Leu Glu Lys Glu Glu 325 <210> 10 <211> 330 <212> PRT <213> Methanococcus maripaludis <400> 10 Met Lys Val Phe Tyr Asp Ser Asp Phe Lys Leu Asp Ala Leu Lys Glu 10 Lys Thr Ile Ala Val Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly Arg Ala Gln Ser 25 Leu Asn Met Lys Asp Ser Gly Leu Asn Val Val Gly Leu Arg Lys 40 Asn Gly Ala Ser Trp Asn Asn Ala Lys Ala Asp Gly His Asn Val Met 60 Thr Ile Glu Glu Ala Ala Glu Lys Ala Asp Ile Ile His Ile Leu Ile Pro Asp Glu Leu Gln Ala Glu Val Tyr Glu Ser Gln Ile Lys Pro Tyr 90 Leu Lys Glu Gly Lys Thr Leu Ser Phe Ser His Gly Phe Asn Ile His Tyr Gly Phe Ile Val Pro Pro Lys Gly Val Asn Val Val Leu Val Ala Pro Lys Ser Pro Gly Lys Met Val Arg Arg Thr Tyr Glu Glu Gly Phe 135 Gly Val Pro Gly Leu Ile Cys Ile Glu Ile Asp Ala Thr Asn Asn Ala 155 Phe Asp Ile Val Ser Ala Met Ala Lys Gly Ile Gly Leu Ser Arg Ala 165 170 175 Gly Val Ile Gln Thr Thr Phe Lys Glu Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe 180 185

Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Val	Thr	Glu	Leu 205	Ile	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Thr	Cys	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Ile	Tyr	Gln 240
Lys	Gly	Phe	Lys	Asn 245	Met	Trp	Asn	Asp	<b>Val</b> 250	Ser	Asn	Thr	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Gly	Leu	Thr 260	Arg	Arg	Ser	Arg	Ile 265	Val	Thr	Ala	Asp	Ser 270	Lys	Ala
Ala	Met	Lys 275	Glu	Ile	Leu	Arg	Glu 280	Ile	Gln	Asp	Gly	<b>Arg</b> 285	Phe	Thr	Lys
Glu	Phe 290	Leu	Leu	Glu	Lys	Gln 295	Val	Ser	Tyr	Ala	His 300	Leu	Lys	Ser	Met
Arg 305	Arg	Leu	Glu	Gly	<b>Asp</b> 310	Leu	Gln	Ile	Glu	Glu 315	Val	Gly	Ala	Lys	Leu 320
Arg	Lys	Met	Cys	Gly 325	Leu	Glu	Lys	Glu	Glu 330						
<2102 <2112 <2122 <2132	> 33 > PF	0	ococci	ıs van	ınielii										
<400	> 11														
Met 1	Lys	Val	Phe	Tyr 5	Asp	Ala	Asp	Ile	Lys 10	Leu	Asp	Ala	Leu	Lys 15	Ser
Lys	Thr	Ile	Ala 20	Val	Ile	Gly	Tyr	Gly 25	Ser	Gln	Gly	Arg	Ala 30	Gln	Ser
Leu	Asn	Met 35	Lys	Asp	Ser	Gly	Leu 40	Asn	Val	Val	Val	Gly 45	Leu	Arg	Lys
Asn	Gly 50	Ala	Ser	Trp	Glu	Asn 55	Ala	Lys	Asn	Asp	Gly 60	His	Glu	Val	Leu
Thr 65	Ile	Glu	Glu	Ala	Ser 70	Lys	Lys	Ala	Asp	Ile 75	Ile	His	Ile	Leu	Ile 80

Pro	Asp	Glu	Leu	Gln 85	Ala	Glu	Val	Tyr	Glu 90	Ser	Gln	Ile	Lys	Pro 95	Tyr
Leu	Thr	Glu	Gly 100	Lys	Thr	Leu	Ser	Phe 105	Ser	His	Gly	Phe	Asn 110	Ile	His
Tyr	Gly	Phe 115	Ile	Ile	Pro	Pro	Lys 120	Gly	Val	Asn	Val	Val 125	Leu	Val	Ala
Pro	Lys 130	Ser	Pro	Gly	Lys	Met 135	Val	Arg	Lys	Thr	Tyr 140	Glu	Glu	Gly	Phe
Gly 145	Val	Pro	Gly	Leu	Ile 150	Cys	Ile	Glu	Val	<b>Asp</b> 155	Ala	Thr	Asn	Thr	Ala 160
Phe	Glu	Thr	Val	Ser 165	Ala	Met	Ala	Lys	Gly 170	Ile	Gly	Leu	Ser	<b>Arg</b> 175	Ala
Gly	Val	Ile	Gln 180	Thr	Thr	Phe	Arg	Glu 185	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Val	Thr	Glu	<b>Leu</b> 205	Ile	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ser	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Thr	Cys	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Ile	Tyr	Gln 240
Lys	Gly	Phe	Lys	Asn 245	Met	Trp	His	Asp	Val 250	Ser	Asn	Thr	Ala	G1u 255	Tyr
			260	_	Arg			265					270		
		275			Leu		280				_	285			
	290				Asn	295		-			300		-		
305					Glu 310					Glu 315	Val	Gly	Ser	Lys	<b>Leu</b> 320
<b>Arg</b> <210	_		Cys	Gly 325	Leu	Glu	Lys	Asp	G1u 330						
-211	2/	0													

	<212> PRT <213> Saccharomyces cerevisiae														
<400>	> 12														
Met 1	Leu	Lys	Gln	Ile 5	Asn	Phe	Gly	Gly	Thr 10	Val	Glu	Thr	Val	Tyr 15	Glu
Arg	Ala	Asp	Trp 20	Pro	Arg	Glu	Lys	Leu 25	Leu	Asp	Tyr	Phe	Lys 30	Asn	Asp
Thr	Phe	Ala 35	Leu	Ile	Gly	Tyr	Gly 40	Ser	Gln	Gly	Tyr	Gly 45	Gln	Gly	Leu
Asn	Leu 50	Arg	Asp	Asn	Gly	Leu 55	Asn	Val	Ile	Ile	Gly 60	Val	Arg	Lys	Asp
Gly 65	Ala	Ser	Trp	Lys	Ala 70	Ala	Ile	Glu	Asp	Gly 75	Trp	Val	Pro	Gly	Lys 80
Asn	Leu	Phe	Thr	Val 85	Glu	Asp	Ala	Ile	Lys 90	Arg	Gly	Ser	Tyr	Val 95	Met
Asn	Leu	Leu	Ser 100	Asp	Ala	Ala	Gln	Ser 105	Glu	Thr	Trp	Pro	<b>A</b> la 110	Ile	Lys
Pro	Leu	Leu 115	Thr	Lys	Gly	Lys	Thr 120	Leu	Tyr	Phe	Ser	His 125	Gly	Phe	Ser
Pro	Val 130	Phe	Lys	Asp	Leu	Thr 135	His	Val	Glu	Pro	Pro 140	Lys	Asp	Leu	Asp
Val 145	Ile	Leu	Val	Ala	Pro 150	Lys	Gly	Ser	Gly	<b>Arg</b> 155	Thr	Val	Arg	Ser	Leu 160
Phe	Lys	Glu	Gly	Arg 165	Gly	Ile	Asn	Ser	Ser 170	Tyr	Ala	Val	Trp	Asn 175	Asp
Val	Thr	Gly	Lys 180	Ala	His	Glu	Lys	Ala 185	Gln	Ala	Leu	Ala	Val 190	Ala	Ile
Gly	Ser	Gly 195	Tyr	Val	Tyr	Gln	Thr 200	Thr	Phe	Glu	Arg	Glu 205	Val	Asn	Ser

Asp Leu Tyr Gly Glu Arg Gly Cys Leu Met Gly Gly Ile His Gly Met 210  $\phantom{\bigg|}215\phantom{\bigg|}220\phantom{\bigg|}$ 

225	шец	ALA	GIII	TYL	230	Vai	Leu	Arg	GIU	235	GIY	nis	ser	PIO	240
Glu	Ala	Phe	Asn	Glu 245	Thr	Val	Glu	Glu	Ala 250	Thr	Gln	Ser	Leu	Tyr 255	Pro
Leu	Ile	Gly	Lys 260	Tyr	Gly	Met	Asp	Tyr 265	Met	Tyr	Asp	Ala	Cys 270	Ser	Thr
Thr	Ala	<b>Arg</b> 275	Arg	Gly	Ala	Leu	Asp 280	Trp	Tyr	Pro	Ile	Phe 285	Lys	Asn	Ala
Leu	<b>Lys</b> 290	Pro	Val	Phe	Gln	Asp 295	Leu	Tyr	Glu	Ser	Thr 300	Lys	Asn	Gly	Thr
Glu 305	Thr	Lys	Arg	Ser	Leu 310	Glu	Phe	Asn	Ser	Gln 315	Pro	Asp	Tyr	Arg	Glu 320
Lys	Leu	Glu	Lys	Glu 325	Leu	Asp	Thr	Ile	<b>A</b> rg 330	Asn	Met	Glu	Ile	Trp 335	Lys
Val	Gly	Lys	Glu 340	Val	Arg	Lys	Leu	Arg 345	Pro	Glu	Asn	Gln			
<2102 <2112 <2122 <2132	> 33 > PF	5 RT	us sol	fatario	cus										
<2112 <212	> 33 > PF > Su	5 RT Ifolob		fatario	cus										
<2112 <2122 <2132 <4002	> 33 > PF > Su > 13	5 RT Ifolob	us sol			Ile	Tyr	Thr	Asp 10	Asn	Asp	Ala	Asn	Leu 15	Asp
<211; <212; <213; <400; <b>Met</b> 1	> 33 > PF > Su > 13 <b>Lys</b>	5 RT Ifolob Cys	us sol	Ser 5	Lys				10						
<2113 <2123 <2133 <4003 Met 1	> 33 > PF > Su > 13 Lys	5 RT Ifolob Cys	Thr Gly 20	Ser 5 Lys	Lys Arg	Ile	Ala	Val 25	10	Gly	Tyr	Gly	Ser 30	15	Gly
<211; <212; <213; <400; Met 1 Leu Arg	> 33 > PF > Su > 13 Lys Ile	5 RT Ifolob Cys Lys Trp 35	Thr Gly 20	Ser 5 Lys Gln	Lys Arg Asn	Ile Leu	Ala Arg 40	Val 25 Asp	10 Leu Ser	Gly Gly	Tyr Leu	Gly Asn 45	Ser 30 Val	15 Gln	Gly Val
<211; <212; <213; <400; Met 1 Leu Arg Gly	> 33 > PF > Su > 13 Lys Ile Ala	5 RT Ifolob Cys Lys Trp 35	Thr Gly 20 Ala	Ser 5 Lys Gln	Lys Arg Asn Gly	Ile Leu Lys 55	Ala Arg 40 Ser	Val 25 Asp	10 Leu Ser	Gly Gly Leu	Tyr Leu Ala	Gly Asn 45 Lys	Ser 30 Val	15 Gln Val	Gly Val

Val	Gln	Pro	Tyr 100	Met	Lys	Lys	Gly	Ala 105	Asp	Leu	Val	Phe	Ala 110	His	Gly
Phe	Asn	Ile 115	His	Tyr	Lys	Leu	Ile 120	Asp	Pro	Pro	Lys	Asp 125	Ser	Asp	Val
Tyr	Met 130	Ile	Ala	Pro	Lys	Gly 135	Pro	Gly	Pro	Thr	Val 140	Arg	Glu	Tyr	Tyr
Lys 145	Ala	Gly	Gly	Gly	Val 150	Pro	Ala	Leu	Val	Ala 155	Val	His	Gln	Asp	Val 160
Ser	Gly	Thr	Ala	Leu 165	His	Lys	Ala	Leu	<b>A</b> la 170	Ile	Ala	Lys	Gly	Ile 175	Gly
Ala	Thr	Arg	Ala 180	Gly	Val	Ile	Pro	Thr 185	Thr	Phe	Lys	Glu	Glu 190	Thr	Glu
Thr	Asp	Leu 195	Phe	Gly	Glu	Gln	Val 200	Ile	Leu	Val	Gly	Gly 205	Ile	Met	Glu
Leu	Met 210	Arg	Ala	Ala	Phe	Glu 215	Thr	Leu	Val	Glu	Glu 220	Gly	Tyr	Gln	Pro
Glu 225	Val	Ala	Tyr	Phe	Glu 230	Thr	Ile	Asn	Glu	Leu 235	Lys	Met	Leu	Val	Asp 240
Leu	Val	Tyr	Glu	Lys 245	Gly	Ile	Ser	Gly	Met 250	Leu	Lys	Ala	Val	Ser 255	Asp
Thr	Ala	Lys	Tyr 260	Gly	Gly	Met	Thr	Val 265	Gly	Lys	Phe	Val	Ile 270	Asp	Glu
Ser	Val	<b>Arg</b> 275	Lys	Arg	Met	Lys	Glu 280	Ala	Leu	Gln	Arg	Ile 285	Lys	Ser	Gly
Lys	Phe 290	Ala	Glu	Glu	Trp	Val 295	Glu	Glu	Tyr	Gly	<b>A</b> rg 300	Gly	Met	Pro	Thr
Val 305	Val	Asn	Gly	Leu	Ser 310	Asn	Val	Gln	Asn	Ser 315	Leu	Glu	Glu	Lys	Ile 320
_			Leu	Arg 325	Asp	Leu	Val	Gln	Lys 330	Gly	Lys	Pro	Lys	Ser 335	
<210> 14 <211> 328 <212> PRT <213> Pyrobaculum aerophilum															
<400>	> 14														

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

Gln Arg Gly Ile Tyr Gly Met Leu Asn Gly Val Ser Asp Thr Ala Lys 245 250 Tyr Gly Gly Leu Thr Val Gly Pro Arg Val Ile Asp Glu Asn Val Lys 265 Arg Lys Met Lys Glu Ala Ala Met Arg Val Lys Ser Gly Glu Phe Ala Lys Glu Trp Val Glu Glu Tyr Asn Arg Gly Ala Pro Thr Leu Arg Lys 295 Leu Met Glu Glu Ala Arg Thr His Pro Ile Glu Lys Val Gly Glu Glu Met Arg Lys Leu Leu Phe Gly Pro <210> 15 <211> 338 <212> PRT <213> Ralstonia solanacearum <400> 15 Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Ala Asp Leu Ser Leu Ile Lys Gly Lys Asn Val Thr Ile Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala His Ala Leu Asn Leu Asn Asp Ser Gly Val Lys Val Thr Val Gly Leu Arg Lys Asn Gly Ala Ser Trp Asn Lys Ala Val Asn Ala Gly Leu Gln Val Lys Glu Val Ala Glu Ala Val Lys Asp Ala Asp Val Val Met Ile Leu Leu Pro Asp Glu Gln Ile Ala Asp Val Tyr Lys Asn Glu Val His Gly Asn 90 85 Ile Lys Gln Gly Ala Ala Leu Ala Phe Ala His Gly Phe Asn Val His 100 Tyr Gly Ala Val Ile Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Val Ala

120

115

125

Pro	Lys 130	Ala	Pro	Gly	His	Thr 135	Val	Arg	Gly	Thr	Tyr 140	Ala	Gln	Gly	Gly
Gly 145	Val	Pro	His	Leu	Ile 150	Ala	Val	His	Gln	<b>Asp</b> 155	Lys	Ser	Gly	Ser	Ala 160
Arg	Asp	Ile	Ala	Leu 165	Ser	Tyr	Ala	Thr	Ala 170	Asn	Gly	Gly	Gly	Arg 175	Ala
Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Asn	Phe	Arg	Glu 185	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Thr	Val	Glu	Leu 205	Ile	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Ile	Tyr	Glu 240
Gly	Gly	Ile	Gly	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Arg	Val 265	Val	Thr	Ala	Glu	Thr 270	Lys	Gln
Ala	Met	<b>Lys</b> 275	Gln	Cys	Leu	His	Asp 280	Ile	Gln	Thr	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Ser	Phe 290	Leu	Leu	Glu	Asn	Lys 295	Ala	Gly	Ala	Pro	Thr 300	Leu	Ile	Ser	Arg
Arg 305	Arg	Leu	Thr	Ala	Asp 310	His	Gln	Ile	Glu	Gln 315	Val	Gly	Ala	Lys	Leu 320
Arg	Ala	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Ala	Lys	Asn 330	Lys	Leu	Val	Asp	Gln 335	Ser
Lys	Asn														
<210 <211 <212	> 33	8													
<213	_		monas	aeru	ginosa	a									
<100°	. 16														

Met 1	Arg	Val	Phe	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Tyr	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	His	Ala
Cys	Asn	Leu 35	Lys	Asp	Ser	Gly	Val 40	Asp	Val	Thr	Val	Gly 45	Leu	Arg	Ser
Gly	Ser 50	Ala	Thr	Val	Ala	Lys 55	Ala	Glu	Ala	His	Gly 60	Leu	Lys	Val	Ala
Asp 65	Val	Lys	Thr	Ala	Val 70	Ala	Ala	Ala	Asp	Val 75	Val	Met	Ile	Leu	Thr 80
Pro	Asp	Glu	Phe	Gln 85	Gly	Arg	Leu	Tyr	Lys 90	Glu	Glu	Ile	Glu	Pro 95	Asn
Leu	Lys	Lys	Gly 100	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe 105	Ala	His	Gly	Phe	Ser 110	Ile	His
Tyr	Asn	Gln 115	Val	Val	Pro	Arg	Ala 120	Asp	Leu	Asp	Val	Ile 125	Met	Ile	Ala
Pro	Lys 130	Ala	Pro	Gly	His	Thr 135	Val	Arg	Ser	Glu	Phe 140	Val	Lys	Gly	Gly
Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Ile	Tyr	Gln	<b>Asp</b> 155	Ala	Ser	Gly	Asn	<b>Ala</b> 160
Lys	Asn	Val	Ala	Leu 165	Ser	Tyr	Ala	Cys	Gly 170	Val	Gly	Gly	Gly	<b>Arg</b> 175	Thr
			Glu 180				_	185					190		
		195	Ala				200					205			
	210		Thr			215					220				
225		-	Leu		230		-			235					240
Gly	Gly	Ile	Ala	Asn	Met	Asn	${ t Tyr}$	$\mathtt{Ser}$	Ile	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu	${ t Tyr}$

				245					250					255	
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Ala	Glu	Ser 270	Arg	Ala
Ala	Met	<b>Arg</b> 275	Asn	Ala	Leu	Lys	Arg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Thr	Glu	Gly	Ala 295	Ala	Asn	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Tyr
<b>Arg</b> 305	Arg	Asn	Asn	Ala	<b>A</b> la 310	His	Pro	Ile	Glu	Gln 315	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu 320
Arg	Ala	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Ala	Ala	Asn 330	Lys	Ile	Val	Asp	<b>Lys</b> 335	Ser
Lys	Asn														
<210: <211: <212: <213:	> 33 > PF	8 RT	monas	s fluore	escen	S									
<400	> 17														
Met 1	Lys	Val	Phe	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Tyr	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala
Cys	Asn	Leu 35	Lys	Asp	Ser	Gly	Val 40	Asp	Val	Thr	Val	Gly 45	Leu	Arg	Lys
Gly	Ser 50	Ala	Thr	Val	Ala	Lys 55	Ala	Glu	Ala	His	Gly 60	Leu	Lys	Val	Thr
Asp 65	Val	Ala	Ala	Ala	Val 70	Ala	Gly	Ala	Asp	Leu 75	Val	Met	Ile	Leu	Thr 80
Pro	Asp	Glu	Phe	Gln 85	Ser	Gln	Leu	Tyr	Lys 90	Asn	Glu	Ile	Glu	Pro 95	Asn
Ile	Lys	Lys	Gly 100	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe 105	Ser	His	Gly	Phe	Ala 110	Ile	His

		115					120					125			
Pro	<b>Lys</b> 130	Ala	Pro	Gly	His	Thr 135	Val	Arg	Ser	Glu	Phe 140	Val	Lys	Gly	Gly
Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Ile	Tyr	Gln	Asp 155	Ala	Ser	Gly	Asn	Ala 160
Lys	Asn	Val	Ala	Leu 165	Ser	Tyr	Ala	Ala	Gly 170	Val	Gly	Gly	Gly	<b>A</b> rg 175	Thr
Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	Asp 185	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Thr	Val	Glu	Leu 205	Val	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240
Gly	Gly	Ile	Ala	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Ala	Glu	Ser 270	Arg	Gln
Ala	Met	<b>Arg</b> 275	Asn	Ala	Leu	Lys	<b>A</b> rg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gly	Ile	Glu	Ile 315	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Gly	Ala	<b>A</b> sn 330	Lys	Ile	Val	Asp	Lys 335	Ala
Lys	Asn														
<2102 <2112 <2122 <2132	> 33 > PF	8 RT	ı olera	cea											
<400>	· > 18														

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

	Gly	Ile	Ala	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Ala	Glu	Ser 270	Arg	Ala
Ala	Met	Arg 275	Asn	Ala	Leu	Lys	Arg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Thr	Glu	Gly	Ala 295	Ala	Asn	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Tyr
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Pro	Ile	Glu	Gln 315	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu 320
Arg	Ala	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Ala	Ala	<b>As</b> n 330	Lys	Ile	Val	Asp	Lys 335	Ser
Lys	Asn														
<210	> 19														
<2112 <212															
				-											
<213	- 5	eudor	nonas	fluore	escen	S									
<400			nonas	fluore	escen	S									
<400	> 19		nonas Phe				Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
<400 Met 1	> 19 <b>Lys</b>	Val		Tyr 5	Asp	Lys		-	10					15	
<4003 Met 1 Lys	> 19 Lys Lys	Val Val	Phe Ala	Tyr 5	Asp	Lys Gly	Phe	Gly 25	10 Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	15 Gln	Ala
<4003 Met 1 Lys	> 19 Lys Lys Asn	Val Val Leu 35	Phe Ala 20	Tyr 5 Ile Asp	Asp Ile Ser	Lys Gly Gly	Phe Val 40	Gly 25	10 Ser Val	Gln Thr	Gly Val	His Gly 45	Ala 30 Leu	15 Gln Tyr	Ala Lys
<4003 Met 1 Lys Cys	Lys Lys Asn Ala	Val Val Leu 35	Phe Ala 20 Lys	Tyr 5 Ile Asp	Asp Ile Ser	Lys Gly Gly Lys 55	Phe Val 40	Gly 25 Asp	Ser Val	Gln Thr His	Gly Val Gly 60	His Gly 45 Phe	Ala 30 Leu Lys	15 Gln Tyr Val	Ala Lys
<4003 Met 1 Lys Cys Gly Asp 65	Lys Lys Asn Ala 50	Val Leu 35 Ala	Phe Ala 20 Lys Asp	Tyr 5 Ile Asp Ala	Asp Ile Ser Ala Val 70	Lys Gly Gly Lys 55	Phe Val 40 Ala	Gly 25 Asp Glu	Ser Val Ala	Gln Thr His Leu 75	Gly Val Gly 60	His Gly 45 Phe Met	Ala 30 Leu Lys	Gln Tyr Val Leu	Ala Lys Thr

Tyr	Asn	Gln 115	Val	Val	Pro	Arg	Ala 120	Asp	Leu	Asp	Val	Ile 125	Met	Ile	Ala
Pro	Lys 130	Ala	Pro	Gly	His	Thr 135	Val	Arg	Ser	Glu	Phe 140	Val	Lys	Gly	Gly
Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Ile	Tyr	Gln	<b>Asp</b> 155	Ala	Ser	Gly	Asn	Ala 160
Lys	Asn	Val	Ala	Leu 165	Ser	Tyr	Ala	Ala	<b>Ala</b> 170	Val	Gly	Gly	Gly	<b>A</b> rg 175	Thr
Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	<b>Asp</b> 185	Glu	Thr	Glu	Thr	<b>Asp</b> 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Thr	Val	Glu	Leu 205	Val	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240
Gly	Gly	Ile	Ala	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Ala	Glu	Ser 270	Arg	Gln
Ala	Met	<b>Arg</b> 275	Asn	Ala	Leu	Lys	<b>A</b> rg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gly	Ile	Glu	Ile 315	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Gly	Ala	<b>As</b> n 330	Lys	Ile	Val	Asp	<b>Lys</b> 335	Ala
Lys	Asn														
- <210		ı													
<2112 <2122 <2132	> PF	RT	omona	as fluc	resce	ns									
<400	> 20														

Met 1	ьys	vaı	Pne	Tyr 5	Asp	ьys	Asp	Cys	10	Leu	ser	тте	TTE	15	GТĀ
Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala
Cys	Asn	Leu 35	Lys	Asp	Ser	Gly	Val 40	Asp	Val	Thr	Val	Gly 45	Leu	Tyr	Lys
Gly	Ala 50	Ala	Asp	Ala	Ala	Lys 55	Ala	Glu	Ala	His	Gly 60	Phe	Lys	Val	Thr
Asp 65	Val	Ala	Ala	Ala	Val 70	Ala	Gly	Ala	Asp	Leu 75	Val	Met	Ile	Leu	Thr 80
Pro	Asp	Glu	Phe	Gln 85	Ser	Gln	Leu	Tyr	Lys 90	Asn	Glu	Ile	Glu	Pro 95	Asn
Ile	Lys	Lys	Gly 100	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe 105	Ser	His	Gly	Phe	Ala 110	Ile	His
Tyr	Asn	Gln 115	Val	Val	Pro	Arg	Ala 120	Asp	Leu	Asp	Val	Ile 125	Met	Ile	Ala
Pro	Lys 130	Ala	Pro	Gly	His	Thr 135	Val	Arg	Ser	Glu	Phe 140	Val	Lys	Gly	Gly
Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Ile	Tyr	Gln	<b>Asp</b> 155	Ala	Ser	Gly	Asn	Ala 160
Lys	Asn	Val	Ala	Leu 165	Ser	Tyr	Ala	Ala	<b>A</b> la 170	Val	Gly	Gly	Gly	Arg 175	Thr
Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	<b>Asp</b> 185	Glu	Thr	Glu	Thr	<b>Asp</b> 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Thr	Val	Glu	Leu 205	Val	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240

	Gly G	3ly	Ile	Ala	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
	Gly G	lu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Ala	Glu	Ser 270	Arg	Gln
	Ala M		<b>Arg</b> 275	Asn	Ala	Leu	Lys	Arg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
	Met P	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
	Arg A	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gly	Ile	Glu	Ile 315	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu 320
	Arg S	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Gly	Ala	<b>Asn</b> 330	Lys	Ile	Val	Asp	Lys 335	Ala
	Lys A	Asn														
5	<210><211><211><212><213>	21 24 AD		ia arti	ficial											
	<220> <223>	cel	oador	рВАГ	266											
	<400>	21														
	ctctctac	ctg ttt	tctcca	ita ccc	g					24						
10	<210> <211> <212> <213>	22 27 AD sec		ia arti	ficial											
15	<220> <223>	cel	oador	PF5-	53Mt											
	<220> <221> <222> <223>	(26	5)(27	ística_ ′) c, g, o	<del>-</del>	а										
20	<400>	22														
	caagcc	gtgg	gcttc	agcct	tggckı	nn				27						
25	<210> <211> <212> <213>			cia arti	ficial											
	<220> <223>	cel	oador	рВАГ	866											
	<400>	23														
	cggtttca	agt ct	tcgtcc	ttg aa	g					23						
30	<210>	24														

	<2112 <2122 <2132	> PF	-	ia arti	ficial											
5	<220 <223		nstruc	cto sin	tético	del m	utante	de ilo	:V							
	<400>	> 24	ļ													
	Met 1	Lys	Val	Phe	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
	Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala
	Cys	Asn	Leu 35	Lys	Asp	Ser	Gly	Val 40	Asp	Val	Thr	Val	Gly 45	Leu	Tyr	Lys
	Gly	Ala 50	Ala	Asp	Ala	Ala	Lys 55	Ala	Glu	Ala	His	Gly 60	Phe	Lys	Val	Thr
	Asp 65	Val	Ala	Ala	Ala	Val 70	Ala	Gly	Ala	Asp	Leu 75	Val	Met	Ile	Leu	Thr
	Pro	Asp	Glu	Phe	Gln 85	Ser	Gln	Leu	Tyr	Lys 90	Asn	Glu	Ile	Glu	Pro 95	Asr
	Ile	Lys	Lys	Gly 100	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe 105	Ser	His	Gly	Phe	Ala 110	Ile	His
	Tyr	Asn	Gln 115	Val	Val	Pro	Arg	Ala 120	Asp	Leu	Asp	Val	Ile 125	Met	Ile	Ala
	Pro	<b>Lys</b> 130	Ala	Pro	Gly	His	Thr 135	Val	Arg	Ser	Glu	Phe 140	Val	Lys	Gly	Gly
	Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Ile	Tyr	Gln	Asp 155	Val	Ser	Gly	Asn	Ala
	Lys	Asn	Val		Leu 165		Tyr	Ala		Gly 170		Gly	Gly	Gly	Arg 175	

Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Lys Asp Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe

			180					185					190		
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Thr	Val	Glu	Leu 205	Val	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240
Gly	Gly	Ile	Ala	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Ala	Glu	Ser 270	Arg	Gln
Ala	Met	<b>Arg</b> 275	Asn	Ala	Leu	Lys	Arg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gly	Ile	Glu	Ile 315	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Gly	Ala	Asn 330	Lys	Ile	Val	Asp	Lys 335	Ala
Lys	Asn														
<210 <211 <212 <213	> 33 > PF	8	ia arti	ficial											
<220 <223		nstruc	to sin	tético	del mi	utante	de ilc	:V							
<400>															
Met 1	Lys	Val	Phe	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala
Leu	Asn	Leu 35	Lys	Asp	Ser	Gly	Val 40	Asp	Val	Thr	Val	Gly 45	Leu	Tyr	Lys

Gly	Ala 50	Ala	Asp	Ala	Ala	Lys 55	Ala	Glu	Ala	His	Gly 60	Phe	Lys	Val	Thr
Asp 65	Val	Ala	Ala	Ala	Val 70	Ala	Gly	Ala	Asp	Leu 75	Val	Met	Ile	Leu	Thr 80
Pro	Asp	Glu	Phe	Gln 85	Ser	Gln	Leu	Tyr	Lys 90	Asn	Glu	Ile	Glu	Pro 95	Asn
Ile	Lys	Lys	Gly 100	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe 105	Ser	His	Gly	Phe	Ala 110	Ile	His
Tyr	Asn	Gln 115	Val	Val	Pro	Arg	Ala 120	Asp	Leu	Asp	Val	Ile 125	Met	Ile	Ala
Pro	Lys 130	Ala	Pro	Gly	His	Thr 135	Val	Arg	Ser	Glu	Phe 140	Val	Lys	Gly	Gly
Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Ile	Tyr	Gln	<b>Asp</b> 155	Ala	Ser	Gly	Asn	Ala 160
Lys	Asn	Val	Ala	Leu 165	Ser	Tyr	Ala	Ala	Gly 170	Val	Gly	Gly	Gly	<b>A</b> rg 175	Thr
Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	Asp 185	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Thr	Val	Glu	<b>Leu</b> 205	Val	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Суѕ	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240
Gly	Gly	Ile	Ala	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Ala	Glu	Ser 270	Arg	Gln
Ala	Met	Arg 275	Asn	Ala	Leu	Lys	Arg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys

Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Thr Gly Tyr Pro Ser Met Thr Ala Lys

	290					295					300				
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gly	Ile	Glu	Ile 315	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Gly	Ala	Asn 330	Lys	Ile	Val	Asp	Lys 335	Ala
Lys	Asn														
<210><211><211><212><213>	> 33 > PF	8 RT	ia arti	fical											
<400>	> 26														
Met 1	Lys	Val	Phe	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala
Leu	Asn	Leu 35	Lys	Asp	Ser	Gly	Val 40	Asp	Val	Thr	Val	Gly 45	Leu	Tyr	Lys
Gly	Ala 50	Ala	Asp	Ala	Ala	Lys 55	Ala	Glu	Ala	His	Gly 60	Phe	Lys	Val	Thr
Asp 65	Val	Ala	Ala	Ala	Val 70	Ala	Gly	Ala	Asp	Leu 75	Val	Met	Ile	Leu	Thr 80
Pro	Asp	Glu	Phe	Gln 85	Ser	Gln	Leu	Tyr	Lys 90	Asn	Glu	Ile	Glu	Pro 95	Asn
Ile	Lys	Lys	Gly 100	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe 105	Ser	His	Gly	Phe	Ala 110	Ile	His
Tyr	Asn	Gln 115	Val	Val	Pro	Arg	Ala 120	Asp	Leu	Asp	Val	Ile 125	Met	Ile	Ala
Pro	<b>Lys</b> 130	Ala	Pro	Gly	His	Thr 135	Val	Arg	Ser	Glu	Phe 140	Val	Lys	Gly	Gly
Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Ile	Tyr	Gln	Asp 155	Val	Ser	Gly	Asn	Ala 160
Lys	Asn	Val	Ala	Leu	Ser	Tyr	Ala	Ala	Gly	Val	Gly	Gly	Gly	Arg	Thr

				165					170					175	
Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	<b>Asp</b> 185	Glu	Thr	Glu	Thr	<b>Asp</b> 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Thr	Val	Glu	Leu 205	Val	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240
Gly	Gly	Ile	Ala	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Ala	Glu	Ser 270	Arg	Gln
Ala	Met	<b>Arg</b> 275	Asn	Ala	Leu	Lys	Arg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gly	Ile	Glu	Ile 315	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Gly	Ala	Asn 330	Lys	Ile	Val	Asp	Lys 335	Ala
Lys	Asn														
<210 <211 <212 <213	> 33 > PF	8 RT	ia artil	ficial											
<220 <223		netrus	to sint	tático	dal m	utanto	de ile	·\/							
<400			io siii	i <del>c</del> iiCO	uei IIII	ulalile	ue IIC	, v							
Met 1			Phe	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala

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

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys

		275					280					285			
Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gly	Ile	Glu	Ile 315	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Gly	Ala	<b>A</b> sn 330	Lys	Ile	Val	Asp	<b>Lys</b> 335	Ala
Lys	Asn														
<2102 <2112 <2122 <2132	> 33 > PF	8 RT	ia arti	ficial											
<220 <223		netruc	to sin	tético	del m	utante	de ila	~\/							
<400			10 SIII	ielico	uei iii	utante	de lic	. v							
Met 1	Lys	Val	Phe	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Tyr	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala
Leu	Asn	Leu 35	Lys	Asp	Ser	Gly	Val 40	Asp	Val	Thr	Val	Gly 45	Leu	Tyr	Lys
Gly	Ala 50	Ala	Asp	Ala	Ala	Lys 55	Ala	Glu	Ala	His	Gly 60	Phe	Lys	Val	Thr
Asp 65	Val	Ala	Ala	Ala	Val 70	Ala	Gly	Ala	Asp	Leu 75	Val	Met	Ile	Leu	Ile 80
Pro	Asp	Glu	Phe	Gln 85	Ser	Gln	Leu	Tyr	Lys 90	Asn	Glu	Ile	Glu	Pro 95	Asn
Ile	Lys	Lys	Gly 100	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe 105	Ser	His	Gly	Phe	Ala 110	Ile	His
Tyr	Asn	Gln 115	Val	Val	Pro	Arg	Ala 120	Asp	Leu	Asp	Val	Ile 125	Met	Ile	Ala
Pro	Lys 130	Ala	Pro	Gly	His	Thr 135	Val	Arg	Ser	Glu	Phe 140	Val	Lys	Gly	Gly

Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Ile	Tyr	Gln	Asp 155	Val	Ser	Gly	Asn	Ala 160
Lys	Asn	Val	Ala	Leu 165	Ser	Tyr	Ala	Ala	<b>A</b> la 170	Val	Gly	Gly	Gly	<b>A</b> rg 175	Thr
Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	Asp 185	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Thr	Val	Glu	Leu 205	Val	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240
Gly	Gly	Ile	Ala	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Ala	Glu	Ser 270	Arg	Gln
Ala	Met	Arg 275	Asn	Ala	Leu	Lys	<b>Arg</b> 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gly	Ile	Glu	Ile 315	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Gly	Ala	<b>Asn</b> 330	Lys	Ile	Val	Asp	Lys 335	Ala
Lys	Asn														
<2102 <2112 <2122 <2132	> 33 > PF	88	cia arti	ficial											
<220 <223		onstruc	cto sin	tético											
<220 <221 <222 <223	> ca > (2	racter 4) (2 aa = T	24)	_	а										
<220 <221 <222	> ca	racter 3)(33	_	_nuev	а										

```
<223> Xaa = Cys o Leu
      <220>
     <221> característica_nueva
     <222> (47)..(47)
     <223> Xaa = Arg o Tyr
     <220>
     <221> característica_nueva
      <222> (50)..(50)
     <223> Xaa = Ser o Ala
     <220>
10
     <221> característica_nueva
     <222>
             (52)..(52)
     <223> Xaa = Thr o Asp
     <220>
15
     <221> característica_nueva
     <222> (53)..(53)
     <223> Xaa = Val o Ala
     <220>
     <221> característica_nueva
     <222> (61)..(61)
<223> Xaa = Leu o Phe
20
     <220>
     <221> característica_nueva
      <222>
             (80)..(80)
25
     <223> Xaa = Thr o Iso
     <220>
     <221> característica_nueva
     <222> (156)..(156)
     <223> Xaa = Ala o Val
30
     <220>
     <221> característica nueva
      <222>
             (170)..(170)
      <223> Xaa = Gly o Ala
      <400> 29
      Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly
                                                  10
      Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Xaa Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala
      Xaa Asn Leu Lys Asp Ser Gly Val Asp Val Thr Val Gly Leu Xaa Lys
35
                                        40
                                                                45
```

Gly Xaa Ala Xaa Xaa Ala Lys Ala Glu Ala His Gly Xaa Lys Val Thr 50 55 60 Asp Val Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala Asp Leu Val Met Ile Leu Xaa 75 Pro Asp Glu Phe Gln Ser Gln Leu Tyr Lys Asn Glu Ile Glu Pro Asn Ile Lys Lys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ser His Gly Phe Ala Ile His 105 Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala 120 Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Val Lys Gly Gly 135 Gly Ile Pro Asp Leu Ile Ala Ile Tyr Gln Asp Xaa Ser Gly Asn Ala Lys Asn Val Ala Leu Ser Tyr Ala Ala Xaa Val Gly Gly Gly Arg Thr 165 170 175 Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Lys Asp Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe 180 185 Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Thr Val Glu Leu Val Lys Ala 195 200 Gly Phe Glu Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Glu Met Ala Tyr Phe Glu Cys Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met Tyr Glu 225 Gly Gly Ile Ala Asn Met Asn Tyr Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Tyr Gly Glu Tyr Val Thr Gly Pro Glu Val Ile Asn Ala Glu Ser Arg Gln Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Thr Gly Tyr Pro Ser Met Thr Ala Lys

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Ile Ile Gly Glu Gln Leu

310

305

Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Gly Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Ala 330 Lys Asn <210> 30 <211> 331 <212> PRT <213> Natronomonas pharaanis <400> 30 Met Thr Asp Ala Thr Ile Tyr Tyr Asp Asp Ala Glu Ser Thr Val Leu Asp Asp Lys Thr Val Ala Val Leu Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala His Ala Gln Asn Leu Asp Asp Ser Gly Val Asp Val Val Val Gly Leu Arg Glu Asp Ser Ser Ser Arg Ser Ala Ala Glu Ala Asp Gly Leu Asp Val Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Glu Gln Ala Asp Leu Val Ser 70 Val Leu Val Pro Asp Thr Val Gln Pro Ala Val Tyr Glu Gln Ile Glu 85 Asp Val Leu Gln Pro Gly Asp Thr Leu Gln Phe Ala His Gly Phe Asn 100 Ile His Tyr Gly Gln Ile Glu Pro Ser Glu Asp Val Asn Val Thr Met 115 Val Ala Pro Lys Ser Pro Gly His Leu Val Arg Arg Asn Tyr Glu Asn 130 135 Asp Glu Gly Thr Pro Gly Leu Leu Ala Val Tyr Gln Asp Pro Ser Gly 145 Glu Ala His Asp Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Lys Ala Ile Gly Cys Thr 165 170

Arg	AIA	СТУ	180	Vai	GIU	III	THE	185	Arg	GIU	GIU	III	190	III	ASP
Leu	Phe	Gly 195	Glu	Gln	Ala	Val	Leu 200	Cys	Gly	Gly	Val	Thr 205	Ser	Leu	Val
Lys	Thr 210	Gly	Tyr	Glu	Thr	Leu 215	Val	Asp	Ala	Gly	Tyr 220	Ser	Pro	Glu	Met
Ala 225	Tyr	Phe	Glu	Cys	Leu 230	Asn	Glu	Leu	Lys	Leu 235	Ile	Val	Asp	Leu	Met 240
Tyr	Glu	Gly	Gly	Asn 245	Ser	Glu	Met	Trp	<b>Asp</b> 250	Ser	Val	Ser	Asp	Thr 255	Ala
Glu	Tyr	Gly	Gly 260	Leu	Thr	Arg	Gly	<b>Asp</b> 265	Arg	Ile	Val	Asp	<b>Asp</b> 270	His	Ala
Arg	Glu	<b>Lys</b> 275	Met	Glu	Glu	Val	Leu 280	Glu	Glu	Val	Gln	<b>As</b> n 285	Gly	Thr	Phe
Ala	Arg 290	Glu	Trp	Ile	Ser	Glu 295	Asn	Gln	Ala	Gly	Arg 300	Pro	Ser	Tyr	Lys
Gln 305	Leu	Arg	Ala	Ala	Glu 310	Lys	Asn	His	Asp	Ile 315	Glu	Ala	Val	Gly	Glu 320
Asp	Leu	Arg	Ala	Leu 325	Phe	Ala	Trp	Gly	Asp 330	Asp					
<210 <211 <212 <213	> 34 > PF	2 RT	subtili	s sub:	sp. su	btilis									
<400	> 31														
Met 1	Val	Lys	Val	Tyr 5	Tyr	Asn	Gly	Asp	Ile 10	Lys	Glu	Asn	Val	Leu 15	Ala
Gly	Lys	Thr	Val 20	Ala	Val	Ile	Gly	Tyr 25	Gly	Ser	Gln	Gly	His 30	Ala	His
Ala	Leu	Asn 35	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly 40	Val	Asp	Val	Ile	Val 45	Gly	Val	Arg
Gln	Gly 50	Lys	Ser	Phe	Thr	Gln 55	Ala	Gln	Glu	Asp	Gly 60	His	Lys	Val	Phe

Ser 65	Val	Lys	Glu	Ala	Ala 70	Ala	Gln	Ala	Glu	Ile 75	Ile	Met	Val	Leu	Leu 80
Pro	Asp	Glu	Gln	Gln 85	Gln	Lys	Val	Tyr	Glu 90	Ala	Glu	Ile	Lys	Asp 95	Glu
Leu	Thr	Ala	Gly 100	Lys	Ser	Leu	Val	Phe 105	Ala	His	Gly	Phe	Asn 110	Val	His
Phe	His	Gln 115	Ile	Val	Pro	Pro	Ala 120	Asp	Val	Asp	Val	Phe 125	Leu	Val	Ala
Pro	Lys 130	Gly	Pro	Gly	His	Leu 135	Val	Arg	Arg	Thr	Tyr 140	Glu	Gln	Gly	Ala
Gly 145	Val	Pro	Ala	Leu	Phe 150	Ala	Ile	Tyr	Gln	Asp 155	Val	Thr	Gly	Glu	Ala 160
Arg	Asp	Lys	Ala	Leu 165	Ala	Tyr	Ala	Lys	Gly 170	Ile	Gly	Gly	Ala	Arg 175	Ala
Gly	Val	Leu	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	Glu 185	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Leu	Ser	Ala	Leu 205	Val	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Thr	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Gln	Pro 220	Glu	Leu	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240
Glu	Gly	Leu	Ala	Gly 245	Met	Arg	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asp	Thr	Ala	Gln 255	Trp
Gly	Asp	Phe	Val 260	Ser	Gly	Pro	Arg	Val 265	Val	Asp	Ala	Lys	Val 270	Lys	Glu
Ser	Met	Lys 275	Glu	Val	Leu	Lys	<b>Asp</b> 280	Ile	Gln	Asn	Gly	Thr 285	Phe	Ala	Lys
Glu	Trp 290	Ile	Val	Glu	Asn	Gln 295	Val	Asn	Arg	Pro	<b>Arg</b> 300	Phe	Asn	Ala	Ile
Δer	Δla	Sor	Glu	Aen	Glu	Hie	Glr	Tle	Gl 11	Va1	Va 1	G1 57	Ara	T.378	T.011

305					310					315					320
Arg	Glu	Met	Met	Pro 325	Phe	Val	Lys	Gln	Gly 330	Lys	Lys	Lys	Glu	<b>Ala</b> 335	Val
Val	Ser	Val	Ala 340	Gln	Asn										
<2102 <2112 <2122 <2132	> 33 > PF	8 RT	oacteri	um glı	utamio	cun									
<400	> 32														
Met 1	Ala	Ile	Glu	Leu 5	Leu	Tyr	Asp	Ala	Asp 10	Ala	Asp	Leu	Ser	Leu 15	Ile
Gln	Gly	Arg	Lys 20	Val	Ala	Ile	Val	Gly 25	Tyr	Gly	Ser	Gln	Gly 30	His	Ala
His	Ser	Gln 35	Asn	Leu	Arg	Asp	Ser 40	Gly	Val	Glu	Val	Val 45	Ile	Gly	Leu
Arg	Glu 50	Gly	Ser	Lys	Ser	Ala 55	Glu	Lys	Ala	Lys	Glu 60	Ala	Gly	Phe	Glu
Val 65	Lys	Thr	Thr	Ala	Glu 70	Ala	Ala	Ala	Trp	Ala 75	Asp	Val	Ile	Met	Leu 80
Leu	Ala	Pro	Asp	Thr 85	Ser	Gln	Ala	Glu	Ile 90	Phe	Thr	Asn	Asp	Ile 95	Glu
Pro	Asn	Leu	Asn 100	Ala	Gly	Asp	Ala	Leu 105	Leu	Phe	Gly	His	Gly 110	Leu	Asn
Ile	His	Phe 115	Asp	Leu	Ile	Lys	Pro 120	Ala	Asp	Asp	Ile	Ile 125	Val	Gly	Met
Val	<b>Ala</b> 130	Pro	Lys	Gly	Pro	Gly 135	His	Leu	Val	Arg	Arg 140	Gln	Phe	Val	Asp
Gly 145	Lys	Gly	Val	Pro	Cys 150	Leu	Ile	Ala	Val	<b>Asp</b> 155	Gln	Asp	Pro	Thr	Gly 160
Thr	Ala	Gln	Ala	Leu 165	Thr	Leu	Ser	Tyr	<b>A</b> la 170	Ala	Ala	Ile	Gly	Gly 175	Ala
Ara	Δla	G1 v	Va l	Tla	Pro	Thr	Thr	Dhe	Gl 11	Δla	Glu	Thr	Va 1	Thr	Δen

			180					185					190		
Leu	Phe	Gly 195	Glu	Gln	Ala	Val	Leu 200	Cys	Gly	Gly	Thr	Glu 205	Glu	Leu	Val
Lys	Val 210	Gly	Phe	Glu	Val	Leu 215	Thr	Glu	Ala	Gly	Tyr 220	Glu	Pro	Glu	Met
Ala 225	Tyr	Phe	Glu	Val	Leu 230	His	Glu	Leu	Lys	Leu 235	Ile	Val	Asp	Leu	Met 240
Phe	Glu	Gly	Gly	Ile 245	Ser	Asn	Met	Asn	Tyr 250	Ser	Val	Ser	Asp	Thr 255	Ala
Glu	Phe	Gly	Gly 260	Tyr	Leu	Ser	Gly	Pro 265	Arg	Val	Ile	Asp	<b>A</b> la 270	Asp	Thr
Lys	Ser	<b>Arg</b> 275	Met	Lys	Asp	Ile	Leu 280	Thr	Asp	Ile	Gln	<b>Asp</b> 285	Gly	Thr	Phe
Thr	<b>Lys</b> 290	Arg	Leu	Ile	Ala	Asn 295	Val	Glu	Asn	Gly	<b>Asn</b> 300	Thr	Glu	Leu	Glu
Gly 305	Leu	Arg	Ala	Ser	Tyr 310	Asn	Asn	His	Pro	Ile 315	Glu	Glu	Thr	Gly	Ala 320
Lys	Leu	Arg	Asp	Leu 325	Met	Ser	Trp	Val	Lys 330	Val	Asp	Ala	Arg	<b>Ala</b> 335	Glu
Thr	Ala														
<2102 <2112 <2122 <2132	> 33 > PF	9 RT	oririlur	n moli	schiar	num									
<2202 <2212 <2222 <2232	> ca > (3	10)(3		_		amino	ácido	de ori	gen n	atural					
<400	> 33														
Met 1	Arg	Val	Tyr	Tyr 5	Asp	Arg	Asp	Ala	Asp 10	Val	Asn	Leu	Ile	Lys 15	Ser
Lys	Lys	Val	Ala 20	Val	Ile	Gly	Tyr	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	His	Val

Leu	Asn	Leu 35	Arg	Asp	Ser	Gly	Val 40	Lys	Asp	Val	Ala	Val 45	Ala	Leu	Arg
Pro	Gly 50	Ser	Ala	Ser	Ile	Lys 55	Lys	Ala	Glu	Ala	Glu 60	Gly	Leu	Lys	Val
Leu 65	Thr	Pro	Ala	Glu	Ala 70	Ala	Ala	Trp	Ala	Asp 75	Val	Val	Met	Ile	Leu 80
Thr	Pro	Asp	Glu	Leu 85	Gln	Ala	Asp	Leu	<b>Tyr</b> 90	Lys	Ser	Glu	Leu	<b>Ala</b> 95	Ala
Asn	Leu	Lys	Pro 100	Gly	Ala	Ala	Leu	Val 105	Phe	Ala	His	Gly	Leu 110	Ala	Ile
His	Phe	<b>Lys</b> 115	Leu	Ile	Glu	Ala	<b>Arg</b> 120	Ala	Asp	Leu	Asp	Val 125	Phe	Met	Val
Ala	Pro 130	Lys	Gly	Pro	Gly	His 135	Thr	Val	Arg	Gly	Glu 140	Tyr	Leu	Lys	Gly
Gly 145	Gly	Val	Pro	Cys	Leu 150	Val	Ala	Val	Ala	Gln 155	Asn	Pro	Thr	Gly	<b>Asn</b> 160
Ala	Leu	Glu	Leu	Ala 165	Leu	Ser	Tyr	Ala	Ser 170	Ala	Ile	Gly	Gly	Gly 175	Arg
Ser	Gly	Ile	Ile 180	Glu	Thr	Thr	Phe	<b>A</b> rg 185	Glu	Glu	Суѕ	Glu	Thr 190	Asp	Leu
Phe	Gly	Glu 195	Gln	Val	Val	Leu	Cys 200	Gly	Gly	Leu	Ser	Lys 205	Leu	Ile	Gln
Tyr	Gly 210	Phe	Glu	Thr	Leu	Val 215	Glu	Ala	Gly	Tyr	Ala 220	Pro	Glu	Met	Ala
Tyr 225	Phe	Glu	Cys	Leu	His 230	Glu	Val	Lys	Leu	Ile 235	Val	Asp	Leu	Ile	Tyr 240
Glu	Gly	Gly	Ile	Ala 245	Asn	Met	Arg	Tyr	Ser 250	Ile	Ser	Asn	Thr	Ala 255	Glu
Tyr	Gly	Asp	<b>Tyr</b> 260	Val	Thr	Gly	Ser	<b>Arg</b> 265	Ile	Ile	Thr	Glu	<b>Ala</b> 270	Thr	Lys
Ala	Glu	Met 275	Lys	Arg	Val	Leu	Ala 280	Asp	Ile	Gln	Ser	Gly 285	Arg	Phe	Val

Arg	Asp 290	Trp	Met	Leu	Glu	Cys 295	Lys	Ala	Gly	Gln	Pro 300	Ser	Phe	Lys	Ala
Thr 305	Arg	Arg	Ile	Gln	<b>Xaa</b> 310	Glu	His	Val	Ile	Glu 315	Val	Val	Gly	Glu	Lys 320
Leu	Arg	Gly	Met	Met 325	Pro	Trp	Ile	Ser	Lys 330	Asn	Lys	Leu	Val	<b>Asp</b> 335	Lys
Ala	Arg	Asn													
<210><211><211><212><213>	> 33 > PF	9 RT	onas n	nobilis											
<400	> 34														
Met 1	Lys	Val	Tyr	Tyr 5	Asp	Ser	Asp	Ala	Asp 10	Leu	Gly	Leu	Ile	Lys 15	Ser
Lys	Lys	Ile	Ala 20	Ile	Leu	Gly	Tyr	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	His	Ala
Gln	Asn	Leu 35	Arg	Asp	Ser	Gly	Val 40	Ala	Glu	Val	Ala	Ile 45	Ala	Leu	Arg
Pro	Asp 50	Ser	Ala	Ser	Val	Lys 55	Lys	Ala	Gln	Asp	Ala 60	Gly	Phe	Lys	Val
Leu 65	Thr	Asn	Ala	Glu	Ala 70	Ala	Lys	Trp	Ala	Asp 75	Ile	Leu	Met	Ile	Leu 80
Ala	Pro	Asp	Glu	His 85	Gln	Ala	Ala	Ile	Tyr 90	Ala	Glu	Asp	Leu	Lys 95	Asp
Asn	Leu	Arg	Pro 100	Gly	Ser	Ala	Ile	Ala 105	Phe	Ala	His	Gly	<b>Le</b> u 110	Asn	Ile
His	Phe	Gly 115	Leu	Ile	Glu	Pro	Arg 120	Lys	Asp	Ile	Asp	Val 125	Phe	Met	Ile
Ala	Pro 130	Lys	Gly	Pro	Gly	His 135	Thr	Val	Arg	Ser	Glu 140	Tyr	Val	Arg	Gly
Gly 145	Gly	Val	Pro	Cys	Leu 150	Val	Ala	Val	Asp	Gln 155	Asp	Ala	Ser	Gly	Asn 160

Ala	His	Asp	Ile	Ala 165	Leu	Ala	Tyr	Ala	Ser 170	Gly	Ile	Gly	Gly	Gly 175	Arg
Ser	Gly	Val	Ile 180	Glu	Thr	Thr	Phe	Arg 185	Glu	Glu	Val	Glu	Thr 190	Asp	Leu
Phe	Gly	Glu 195	Gln	Ala	Val	Leu	Cys 200	Gly	Gly	Leu	Thr	Ala 205	Leu	Ile	Thr
Ala	Gly 210	Phe	Glu	Thr	Leu	Thr 215	Glu	Ala	Gly	Tyr	Ala 220	Pro	Glu	Met	Ala
Phe 225	Phe	Glu	Cys	Met	His 230	Glu	Met	Lys	Leu	Ile 235	Val	Asp	Leu	Ile	Tyr 240
Glu	Ala	Gly	Ile	Ala 245	Asn	Met	Arg	Tyr	Ser 250	Ile	Ser	Asn	Thr	Ala 255	Glu
Tyr	Gly	Asp	Ile 260	Val	Ser	Gly	Pro	Arg 265	Val	Ile	Asn	Glu	Glu 270	Ser	Lys
Lys	Ala	Met 275	Lys	Ala	Ile	Leu	Asp 280	Asp	Ile	Gln	Ser	Gly 285	Arg	Phe	Val
Ser	<b>Lys</b> 290	Phe	Val	Leu	Asp	Asn 295	Arg	Ala	Gly	Gln	Pro 300	Glu	Leu	Lys	Ala
Ala 305	Arg	Lys	Arg	Met	Ala 310	Ala	His	Pro	Ile	Glu 315	Gln	Val	Gly	Ala	Arg 320
Leu	Arg	Lys	Met	Met 325	Pro	Trp	Ile	Ala	Ser 330	Asn	Lys	Leu	Val	<b>Asp</b> 335	Lys
Ala	Arg	Asn													
<210>															
<2112 <2122 <2132	> PF	RT	nicola	ehrlic	hei										
<400>	> 35														
Met 1	Gln	Val	Tyr	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Ala	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
Lys	Lys	Val	Ala 20	Val	Ile	Gly	Tyr	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	His	Ala

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

		275					280					285			
Glu	Phe 290	Val	Leu	Glu	Asn	Gln 295	Ala	Gly	Cys	Pro	Thr 300	Leu	Thr	Ala	Arg
Arg 305	Arg	Leu	Ala	Ala	Glu 310	His	Glu	Ile	Glu	<b>Val</b> 315	Val	Gly	Glu	Arg	Leu 320
Arg	Gly	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Asn	Ala	Asn 330	Lys	Leu	Val	Asp	<b>Lys</b> 335	Asp
Lys	Asn														
<2102 <2112 <2122 <2132	> 34 > PF > Ca	0 RT ampylo	obacte	er lari											
<400			Sor	Tlo	Ф.,,,	Ф.,,,	7 cn	Tve	λen	Cvs	λen	Tlo	λen	Ton	T10
1	Ala	vai	261	5	TYL	TYT	rsp	пуз	10	Cys	rsp	116	ASII	15	116
Lys	Ser	Lys	Lys 20	Val	Ala	Ile	Ile	Gly 25	Phe	Gly	Ser	Gln	Gly 30	His	Ala
His	Ala	Met 35	Asn	Leu	Arg	Asp	Ser 40	Gly	Val	Glu	Val	Ile 45	Ile	Gly	Leu
Lys	Glu 50	Gly	Gly	Gln	Ser	Trp 55	Ala	Lys	Ala	Gln	Lys 60	Ala	Asn	Phe	Ile
Val 65	Lys	Ser	Val	Lys	Glu 70	Ala	Thr	Lys	Glu	Ala 75	Asp	Leu	Ile	Met	Ile 80
Leu	Ala	Pro	Asp	Glu 85	Ile	Gln	Ser	Glu	Ile 90	Phe	Asn	Glu	Glu	Ile 95	Lys
Pro	Glu	Leu	Lys 100	Ala	Gly	Lys	Thr	Leu 105	Ala	Phe	Ala	His	Gly 110	Phe	Asn
Ile	His	Tyr 115	Gly	Gln	Ile	Val	Ala 120	Pro	Lys	Gly	Ile	Asp 125	Val	Ile	Met
Ile	Ala 130	Pro	Lys	Ala	Pro	Gly 135	His	Thr	Val	Arg	His 140	Glu	Phe	Ser	Ile
Gly	Gly	Gly	Thr	Pro	Cys	Leu	Ile	Ala	Ile	His	Gln	Asp	Glu	Ser	Lys

145	150		155	160
Asn Ala Lys A	Asn Leu Ala 165	Leu Ser Tyr	Ala Ser Ala Ile 170	Gly Gly Gly 175
_	Ile Ile Glu 180	Thr Thr Phe 185	Lys Ala Glu Thr	Glu Thr Asp 190
Leu Phe Gly (	Glu Gln Ala	Val Leu Cys 200	Gly Gly Leu Ser 205	Ala Leu Ile
Gln Ala Gly I 210	Phe Glu Thr	Leu Val Glu 215	Ala Gly Tyr Glu 220	Pro Glu Met
Ala Tyr Phe ( 225	Glu Cys Leu 230	His Glu Met	Lys Leu Ile Val 235	Asp Leu Ile 240
Tyr Gln Gly (	Gly Ile Ala 245	Asp Met Arg	Tyr Ser Val Ser 250	Asn Thr Ala 255
	Asp Tyr Ile 260	Thr Gly Pro 265	Lys Ile Ile Thr	Lys Glu Thr 270
Lys Glu Ala M 275	Met Lys Gly	Val Leu Lys 280	Asp Ile Gln Asn 285	Gly Ser Phe
Ala Lys Asp I 290	Phe Ile Leu	Glu Arg Arg 295	Ala Asn Phe Ala 300	Arg Met His
Ala Glu Arg 1 305	Lys Leu Met 310	Asn Asp Ser	Leu Ile Glu Lys 315	Thr Gly Arg 320
Glu Leu Arg A	Ala Met Met 325	Pro Trp Ile	Ser Ala Lys Lys 330	Leu Val Asp 335
Lys Asp Lys A	Asn 340			
<210> 37 <211> 338 <212> PRT <213> Marinoba	ncter aquaeolei			
<400> 37				
Met Gln Val 1	Tyr Tyr Asp 5	Lys Asp Cys	Asp Leu Ser Ile 10	Ile Gln Gly 15
Lys Lys Val A	Ala Ile Leu	Gly Phe Gly	Ser Gln Gly His	Ala His Ala

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

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Ser Gly Glu Tyr Ala Lys 275 280 285	ŀ													
Met Phe Ile Ser Glu Gly Ala Leu Asn Tyr Pro Ser Met Thr Ala Arg 290 295 300	ŗ													
Arg Arg Gln Asn Ala Ala His Glu Ile Glu Thr Val Gly Glu Lys Leu 305 310 315 320														
Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Ser Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Asp 325 330 335	>													
Lys Asn														
<210> 38 <211> 338 <212> PRT <213> Psychrobacter arcticus														
<400> 38														
Met Asn Val Tyr Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Val Gln Gly 1 5 10 15	,													
Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala His Ala 20 25 30	L													
Leu Asn Leu Gln Asp Ser Asn Val Asp Val Thr Val Gly Leu Arg Ala 35 40 45	ì													
Asp Ser Gly Ser Trp Lys Lys Ala Glu Asn Ala Gly Leu Lys Val Ala 50 55 60	L													
Glu Val Glu Glu Ala Val Lys Ala Ala Asp Ile Ile Met Ile Leu Thr 65 70 75 80	:													
Pro Asp Glu Phe Gln Lys Glu Leu Tyr Asn Asp Val Ile Glu Pro Asr 85 90 95	1													
Ile Lys Gln Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ala His Gly Phe Ala Ile His	\$													
Tyr Asn Gln Val Ile Pro Arg Ser Asp Leu Asp Val Ile Met Val Ala 115 120 125	ì													
Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Ala Lys Gly Gly	7													

Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Ile	Tyr	Gln	Asp 155	Ala	Ser	Gly	Gln	Ala 160
Lys	Gln	Leu	Ala	Leu 165	Ser	Tyr	Ala	Ala	Gly 170	Val	Gly	Gly	Gly	Arg 175	Ser
Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	Asp 185	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Ala	Val	Glu	Leu 205	Val	Lys	Met
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Thr	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240
Gly	Gly	Ile	Ala	Asp 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Glu	Gln	Ser 270	Arg	Glu
Ala	Met	<b>A</b> rg 275	Asn	Ala	Leu	Lys	<b>A</b> rg 280	Ile	Gln	Ser	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Asn	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Arg
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Glu 310	His	Gln	Ile	Glu	Ile 315	Thr	Gly	Ala	Lys	Leu 320
Arg	Gly	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Gly	Gly	Asn 330	Lys	Ile	Ile	Asp	Lys 335	Asp
Lys	Asn														
<2102 <2112 <2122 <2132	> 33 > PF	8 RT	chejue	ensis											
<400	> 39														
Met 1	Gln	Val	Tyr	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly

Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala His Ala Asn Asn Leu Lys Asp Ser Gly Val Asp Val Cys Val Gly Leu Arg Lys 40 Gly Ser Gly Ser Trp Ala Lys Ala Glu Asn Ala Gly Leu Ala Val Lys Glu Val Ala Glu Ala Val Ala Gly Ala Asp Val Val Met Ile Leu Thr Pro Asp Glu Phe Gln Ala Gln Leu Tyr Lys Ser Glu Ile Glu Pro Asn Leu Lys Ser Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ala His Gly Phe Ser Ile His 100 105 Tyr Asn Gln Ile Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala 120 Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Val Lys Gly Gly 130 135 Gly Ile Pro Asp Leu Ile Ala Ile Phe Gln Asp Ala Ser Gly Ser Ala 145 150 Lys Asp Leu Ala Leu Ser Tyr Ala Ser Gly Val Gly Gly Gly Arg Thr 165 Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Lys Asp Glu Thr Glu Thr Asp Leu Phe 185 Gly Glu Gln Ala Val Leu Cys Gly Gly Ala Val Glu Leu Val Lys Ala 200 205 Gly Phe Glu Thr Leu Val Glu Ala Gly Tyr Ala Pro Glu Met Ala Tyr Phe Glu Cys Leu His Glu Leu Lys Leu Ile Val Asp Leu Met Tyr Glu 230 235 Gly Gly Ile Ala Asn Met Asn Tyr Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Tyr 250 Gly Glu Tyr Val Thr Gly Pro Glu Val Ile Asn Asp Gln Ser Arg Ala 260 265 270

Ala Met Arg Asn Ala Leu Lys Arg Ile Gln Asp Gly Glu Tyr Ala Lys 275 280 Met Phe Ile Ala Glu Gly Ala His Asn Tyr Pro Ser Met Thr Ala Tyr Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Pro Ile Glu Gln Val Gly Glu Lys Leu 310 315 Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Ala Ser Asn Lys Ile Val Asp Lys Ser 330 Lys Asn <210> 40 <211> 338 <212> PRT <213> Thiobacillus denitrificans <400> 40 Met Lys Val Tyr Tyr Asp Lys Asp Ala Asp Leu Ser Leu Ile Lys Gln Arg Lys Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Ser Gln Gly His Ala His Ala Asn Asn Leu Lys Asp Ser Gly Val Asp Val Thr Val Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ala Ser Ala Lys Lys Ala Glu Asn Ala Gly Leu Thr Val Lys 50 55 Ser Val Pro Glu Ala Val Ala Gly Ala Asp Leu Val Met Ile Leu Thr Pro Asp Glu Phe Gln Ser Arg Leu Tyr Arg Asp Glu Ile Glu Pro Asn Ile Lys Gln Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ala His Gly Phe Ser Ile His 100 105 Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Val Lys Gly Gly 130 135 140

Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Ile	Tyr	Gln	Asp 155	Ala	Ser	Gly	Lys	Ala 160
Lys	Glu	Thr	Ala	Leu 165	Ser	Tyr	Ala	Ser	<b>A</b> la 170	Ile	Gly	Gly	Gly	<b>A</b> rg 175	Thr
Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	<b>Asp</b> 185	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Ala	Val	Glu	Leu 205	Val	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Asp	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240
Gly	Gly	Ile	Ala	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Val	Lys	Val 265	Ile	Asn	Glu	Gln	Ser 270	Arg	Ala
Ala	Met	Lys 275	Glu	Cys	Leu	Ala	Asn 280	Ile	Gln	Asn	Gly	Ala 285	Tyr	Ala	Lys
Arg	Phe 290	Ile	Leu	Glu	Gly	Gln 295	Ala	Asn	Tyr	Pro	Glu 300	Met	Thr	Ala	Trp
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gln	Ile	Glu	Val 315	Val	Gly	Ala	Lys	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Ala	Ala	Asn 330	Lys	Leu	Val	Asp	His 335	Ser
Lys	Asn														
<210 <211 <212 <213	> 33 > PF	8 RT	cter v	inelan	dii										
<400>	> 41														
Met 1	Lys	Val	Tyr	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Ser

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

Ala	Met	<b>Arg</b> 275	Asn	Ala	Leu	Lys	Arg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Thr	Glu	Gly	Ala 295	Ala	Asn	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Tyr
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	<b>A</b> la 310	His	Gln	Ile	Glu	Val 315	Val	Gly	Glu	Lys	Leu 320
Arg	Thr	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Ala	Ala	Asn 330	Lys	Ile	Val	Asp	<b>Lys</b> 335	Thr
Lys Asn															
<210> 42 <211> 338 <212> PRT <213> Pseudomonas syringae															
<400>	> 42														
Met 1	Lys	Val	Phe	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Tyr	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala
Cys	Asn	Leu 35	Lys	Asp	Ser	Gly	Val 40	Asp	Val	Thr	Val	Gly 45	Leu	Arg	Lys
Gly	Ser 50	Ala	Thr	Val	Ala	Lys 55	Ala	Glu	Ala	His	Gly 60	Leu	Lys	Val	Thr
Asp 65	Val	Ala	Ser	Ala	Val 70	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu 75	Val	Met	Ile	Leu	Thr 80
Pro	Asp	Glu	Phe	Gln 85	Ser	Gln	Leu	Tyr	Lys 90	Asn	Glu	Val	Glu	Pro 95	Asn
Leu	Lys	Lys	Gly 100	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe 105	Ser	His	Gly	Phe	Ala 110	Ile	His
Tyr	Asn	Gln 115	Val	Val	Pro	Arg	Ala 120	Asp	Leu	Asp	Val	Ile 125	Met	Ile	Ala
Pro	Lys 130	Ala	Pro	Gly	His	Thr 135	Val	Arg	Thr	Glu	Phe 140	Val	Lys	Gly	Gly

Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Val	Tyr	Gln	<b>Asp</b> 155	Ala	Ser	Gly	Asn	Ala 160
Lys	Asn	Val	Ala	Leu 165	Ser	Tyr	Ala	Ser	Gly 170	Val	Gly	Gly	Gly	<b>A</b> rg 175	Thr
Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	<b>Asp</b> 185	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Thr	Val	Glu	Leu 205	Val	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240
Gly	Gly	Ile	Ala	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Ala	Glu	Ser 270	Arg	Gln
Ala	Met	Arg 275	Asn	Ala	Leu	Lys	Arg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gly	Ile	Glu	Ile 315	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Ala	Ala	Asn 330	Lys	Ile	Val	Asp	Lys 335	Asp
Lys	Asn														
<210 <211 <212 <213	> 33 > PF	8 RT	monas	s syrin	gae										
<400	> 43														
Met 1	Lys	Val	Phe	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly

Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Tyr	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala
Cys	Asn	Leu 35	Lys	Asp	Ser	Gly	Val 40	Asp	Val	Thr	Val	Gly 45	Leu	Arg	Lys
Gly	Ser 50	Ala	Thr	Val	Ala	Lys 55	Ala	Glu	Ala	His	Gly 60	Leu	Lys	Val	Thr
Asp 65	Val	Ala	Ser	Ala	Val 70	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu 75	Val	Met	Ile	Leu	Thr 80
Pro	Asp	Glu	Phe	Gln 85	Ser	Gln	Leu	Tyr	Lys 90	Asn	Glu	Val	Glu	Pro 95	Asn
Leu	Lys	Lys	Gly 100	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe 105	Ser	His	Gly	Phe	Ala 110	Ile	His
-		115				-	120	_		-		125			Ala
Pro	Lys 130	Ala	Pro	Gly	His	Thr 135	Val	Arg	Thr	Glu	Phe 140	Val	Lys	Gly	Gly
145					150			_		155					Ala 160
_			Ala	165					170					175	
-			Glu 180				-	185					190		
		195				-	200					205		-	Ala
	210		Thr			215					220				
225			Leu		230		-			235	-			-	240
_	_		Ala	245			-		250					255	-
GТĀ	GLU	Tyr	val	ınr	GТĀ	Pro	GLu	val	тте	Asn	Α⊥а	GLu	ser	Arg	Gln

			260					265					270		
Ala	Met	<b>Arg</b> 275	Asn	Ala	Leu	Lys	Arg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Thr	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Glu 310	His	Gly	Ile	Glu	Val 315	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Ala	Ala	<b>A</b> sn 330	Lys	Ile	Val	Asp	Lys 335	Asp
Lys	Asn														
<2102 <2112 <2122 <2132	> 33 > PF	8 RT	nonas	s putid	а										
<400>	> 44														
Met 1	Lys	Val	Phe	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Tyr	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala
Cys	Asn	Leu 35	Lys	Asp	Ser	Gly	Val 40	Asp	Val	Thr	Val	Gly 45	Leu	Arg	Lys
Gly	Ser 50	Ala	Thr	Val	Ala	Lys 55	Ala	Glu	Ala	His	Gly 60	Leu	Lys	Val	Ala
Asp 65	Val	Ala	Thr	Ala	Val 70	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu 75	Val	Met	Ile	Leu	Thr 80
Pro	Asp	Glu	Phe	Gln 85	Gly	Ala	Leu	Tyr	Lys 90	Asn	Glu	Ile	Glu	Pro 95	Asn
Ile	Lys	Lys	Gly 100	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe 105	Ser	His	Gly	Phe	Ser 110	Ile	His
Tyr	Asn	Gln 115	Val	Val	Pro	Arg	Ala 120	Asp	Leu	Asp	Val	Ile 125	Met	Ile	Ala
Pro	T.vs	Ala	Pro	G1 v	His	Thr	Val	Ara	Ser	Glu	Phe	Val	Lvs	Gl v	G1 v

	130					135					140				
Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Ile	Tyr	Gln	<b>Asp</b> 155	Ala	Ser	Gly	Asn	Ala 160
Lys	Asn	Val	Ala	Leu 165	Ser	Tyr	Ala	Ser	Gly 170	Val	Gly	Gly	Gly	Arg 175	Thr
Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	Asp 185	Glu	Thr	Glu	Thr	<b>Asp</b> 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Thr	Val	Glu	Leu 205	Val	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240
Gly	Gly	Ile	Ala	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Glu	Glu	Ser 270	Arg	Lys
Ala	Met	Arg 275	Asn	Ala	Leu	Lys	Arg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Asn	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gly	Ile	Glu	Ile 315	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Ser	Ala	Asn 330	Lys	Ile	Val	Asp	Lys 335	Thr
Lys	Asn														
<210 <211 <212 <213	> 33 > PF	8 RT	monas	s entoi	mophi	la									
<400>	> 45														
Met	Lys	Val	Phe	Tyr	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln	Gly

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

GIĄ	GIU	Tyr	260	Tnr	GТĀ	Pro	GIU	265	TTE	Asn	GIU	GLu	270	Arg	туѕ
Ala	Met	Arg 275	Asn	Ala	Leu	Lys	<b>Arg</b> 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Asn	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gly	Ile	Glu	Ile 315	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Ser	Ala	<b>As</b> n 330	Lys	Ile	Val	Asp	Lys 335	Thr
Lys	Asn														
<210: <211: <212: <213:	> 33 > PF	8 RT .	monas	s men	docina	1									
<400	> 46	i													
Met 1	Lys	Val	Tyr	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Tyr	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala
Cys	Asn	Leu 35	Lys	Asp	Ser	Gly	Val 40	Asp	Val	Thr	Ile	Gly 45	Leu	Arg	Lys
Gly	Ser 50	Ala	Thr	Val	Ala	Lys 55	Ala	Glu	Ala	His	Gly 60	Leu	Lys	Val	Thr
Asp 65	Val	Ala	Ser	Ala	Val 70	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu 75	Val	Met	Ile	Leu	Thr 80
Pro	Asp	Glu	Phe	Gln 85	Gly	Gln	Leu	Tyr	Lys 90	Asn	Glu	Ile	Glu	Pro 95	Asn
Ile	Lys	Lys	Gly 100	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe 105	Ser	His	Gly	Phe	Ala 110	Ile	His
Tyr	Asn	Gln 115	Val	Val	Pro	Arg	Ala 120	Asp	Leu	Asp	Val	Ile 125	Met	Ile	Ala

	Pro	Lys 130	Ala	Pro	Gly	His	Thr 135	Val	Arg	Thr	Glu	Phe 140	Val	Lys	Gly	Gly
	Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Val	Tyr	Gln	<b>Asp</b> 155	Ala	Ser	Gly	Asn	Ala 160
	Lys	Asn	Val	Ala	Leu 165	Ser	Tyr	Ala	Ser	Gly 170	Val	Gly	Gly	Gly	<b>A</b> rg 175	Thr
	Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	Asp 185	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Leu	Phe
	Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Thr	Val	Glu	Leu 205	Val	Lys	Ala
	Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
	Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240
	Gly	Gly	Ile	Ala	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
	Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Ala	Glu	Ser 270	Arg	Gln
	Ala	Met	<b>Arg</b> 275	Asn	Ala	Leu	Lys	Arg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
	Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
	Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gly	Ile	Glu	<b>Val</b> 315	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu 320
	Arg	Ala	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Ala	Ala	Asn 330	Lys	Ile	Val	Asp	Lys 335	Thr
	Lys	Asn														
	<210															
5	<2112 <2122 <2132	> PF	RT	cereu	S											

<400> 47

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

Gly	Asp	Phe	Val 260	Ser	Gly	Pro	Arg	Val 265	Val	Thr	Glu	Asp	Thr 270	Lys	Lys
Ala	Met	Gly 275	Thr	Val	Leu	Ala	Glu 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Thr 285	Phe	Ala	Arg
Gly	Trp 290	Ile	Ala	Glu	His	Lys 295	Ala	Gly	Arg	Pro	Asn 300	Phe	His	Ala	Thr
Asn 305	Glu	Lys	Glu	Asn	Glu 310	His	Glu	Ile	Glu	Val 315	Val	Gly	Arg	Lys	Leu 320
Arg	Glu	Met	Met	Pro 325	Phe	Val	Gln	Pro	<b>Arg</b> 330	Val	Lys	Val	Gly	<b>Met</b> 335	Lys
<210 <211 <212 <213	> 33 > PF	5	cereu	S											
<400	> 48														
Met 1	Lys	Thr	Tyr	Tyr 5	Glu	Lys	Asp	Ala	Asn 10	Val	Glu	Leu	Leu	Lys 15	Gly
Lys	Thr	Val	Ala 20	Val	Ile	Gly	Tyr	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala
Gln	Asn	Leu 35	Arg	Asp	Ser	Gly	Val 40	Glu	Val	Val	Val	Gly 45	Val	Arg	Pro
Gly	Lys 50	Ser	Phe	Glu	Val	Ala 55	Lys	Thr	Asp	Gly	Phe 60	Glu	Val	Met	Ser
Val 65	Ser	Glu	Ala	Val	Arg 70	Thr	Ala	Gln	Val	Val 75	Gln	Met	Leu	Leu	Pro 80
Asp	Glu	Gln	Gln	Ala 85	His	Val	Tyr	Lys	Ala 90	Gly	Val	Glu	Glu	Asn 95	Leu
Arg	Glu	Gly	Gln 100	Met	Leu	Leu	Phe	Ser 105	His	Gly	Phe	Asn	Ile 110	His	Phe
Gly	Gln	Ile 115	Asn	Pro	Pro	Ser	Tyr 120	Val	Asp	Val	Ala	Met 125	Val	Ala	Pro

5

Lys Ser Pro Gly His Leu Val Arg Arg Val Phe Gln Glu Gly Asn Gly 130  $\phantom{\bigg|}135\phantom{\bigg|}135\phantom{\bigg|}140\phantom{\bigg|}$ 

Val 145	Pro	Ala	Leu	Val	Ala 150	Val	His	Gln	Asp	Ala 155	Thr	Gly	Thr	Ala	Leu 160
His	Val	Ala	Leu	Ala 165	Tyr	Ala	Lys	Gly	Val 170	Gly	Cys	Thr	Arg	Ala 175	Gly
Val	Ile	Glu	Thr 180	Thr	Phe	Gln	Glu	Glu 185	Thr	Glu	Thr	Asp	Leu 190	Phe	Gly
Glu	Gln	Thr 195	Val	Leu	Cys	Gly	Gly 200	Val	Thr	Ala	Leu	Val 205	Lys	Ala	Gly
Phe	Glu 210	Thr	Leu	Thr	Glu	Gly 215	Gly	Tyr	Arg	Pro	Glu 220	Ile	Ala	Tyr	Phe
Glu 225	Cys	Leu	His	Glu	Leu 230	Lys	Leu	Ile	Val	Asp 235	Leu	Met	Tyr	Glu	Gly 240
Gly	Leu	Thr	Asn	Met 245	Arg	His	Ser	Ile	Ser 250	Asp	Thr	Ala	Glu	Phe 255	Gly
Asp	Tyr	Val	Thr 260	Gly	Ser	Arg	Ile	Val 265	Thr	Asp	Glu	Thr	Lys 270	Lys	Glu
Met	Lys	Arg 275	Val	Leu	Thr	Glu	Ile 280	Gln	Gln	Gly	Glu	Phe 285	Ala	Lys	Lys
Trp	Ile 290	Leu	Glu	Asn	Gln	Ala 295	Gly	Arg	Pro	Thr	<b>Tyr</b> 300	Asn	Ala	Met	Lys
Lys 305	Ala	Glu	Gln	Asn	His 310	Gln	Leu	Glu	Lys	Val 315	Gly	Ala	Glu	Leu	<b>Arg</b> 320
Glu	Met	Met	Ser	Trp 325	Ile	Asp	Ala	Pro	Lys 330	Glu	Leu	Val	Lys	<b>Lys</b> 335	
<210><211><211><212><213>	> 22 > A[	! DN	ia arti	ficial											
<220> <223>		bador	рВАГ	- 405											
<220><221><222><222><223>	> ca	0)(11	ística_ ) c, g, o	_	a										
<400>	> 49	)													
gctcaa	agcar	nkaa	cctgaa	a gg					22						
<210> <211>															

	<212> <213>		
	<220> <223>	cebador pBAD 427	
5	<222>	característica_nueva (12)(13) n es a, c, g, o t	
	<400>	50	
10	ccttcagg	gtt knntgcttga gc	22
	<210> <211> <212> <213>	21	
15	<220> <223>	cebador pBAD435	
20	<222>	característica_nueva (10)(11) n es a, c, g, o t	
	<400>	51	
	gtagacg	tgn nkgttggcct g	21
25	<210> <211> <212> <213>	21	
	<220> <223>	cebador pBAD456	
30	<220> <221> <222> <223>		
	<400>	52	
	caggcca	aack nncacgtcta c	21
35	<210> <211> <212> <213>	25	
40	<220> <223>	cebador pBAD484	
		característica_nueva (9)(10) n es a, c, g, o t	
45		característica_nueva (15)(16) n es a, c, g, o t	
	<400>	53	
50	ctgaagc	cnn kggcnnkaaa gtgac	25

	<210> <211> <212> <213>	25	
5	<220> <223>	cebador pBAD509	
10	<222>	característica_nueva (10)(11) n es a, c, g, o t	
	<222>	característica_nueva (16)(17) n es a, c, g, o t	
15	<400>	54	
	gtcactttl	kn ngccknnggc ttcag	25
20	<210> <211> <212> <213>	22	
	<220> <223>	Cebador pBAD519	
25	<222>	característica_nueva (10)(11) n es a, c, g, o t	
	<400>	55	
	gcagcc	gttn nkggtgccga ct	22
30	<210> <211> <212> <213>	22	
	<220> <223>	Cebador pBAD541	
35	<222>	característica_nueva (12)(13) n es a, c, g, o t	
	<400>	56	
40	agtcggc	cacc knnaacggct gc	22
	<210> <211> <212> <213>	22	
45	<220> <223>	Cebador pBAD545	
50	<222>	característica_nueva (11)(12) n es a c g o t	

	<400>	57	
	catgatco	etg nnkceggaeg ag	22
5	<210><211><211><212><213>	22	
	<220> <223>	Cebador pBAD567	
10	<222>	característica_nueva (11)(12) n es a, c, g, o t	
	<400>	58	
	ctcgtccg	ggk nncaggatca tg	22
15	<210><211><211><212><213>	23	
20	<220> <223>	Cebador pBAD608	
	<222>	característica_nueva (11)(12) n es a, c, g, o t	
25	<400>	59	
	caagaa	gggc nnkactctgg cct	23
30	<210> <211> <212> <213>	23	
	<220> <223>	Cebador 60 pBAD631	
35	<222>	característica_nueva (12)(13) n es a, c, g, o t	
	<400>	60	
	aggccag	gagt knngcccttc ttg	23
40	<210><211><211><212><213>		
	<220> <223>	Cebador pBAD663	
45		característica_nueva (10)(11) n es a, c, g, o t	
	<400>	61	

	gttgtgc	ctn nkgccgacct cg	22
5	<210> <211> <212> <213>	22	
	<220> <223>	Cebador pBAD685	
10	<222>	característica_nueva (12)(13) n es a, c, g, o t	
	<400>	62	
	cgaggto	eggc knnaggcaca ac	22
15	<210> <211> <212> <213>	491	
	<400>	63	

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

Val	Glu	Glu	Gly	Thr 245	Asp	Pro	Ala	Tyr	Ala 250	Glu	Lys	Leu	Ile	Gln 255	Phe
Gly	Trp	Glu	Thr 260	Ile	Thr	Glu	Ala	Leu 265	Lys	Gln	Gly	Gly	Ile 270	Thr	Leu
Met	Met	Asp 275	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro 280	Ala	Lys	Leu	Arg	Ala 285	Tyr	Ala	Leu
Ser	Glu 290	Gln	Leu	Lys	Glu	Ile 295	Met	Ala	Pro	Leu	Phe 300	Gln	Lys	His	Met
Asp 305	Asp	Ile	Ile	Ser	Gly 310	Glu	Phe	Ser	Ser	Gly 315	Met	Met	Ala	Asp	Trp 320
Ala	Asn	Asp	Asp	Lys 325	Lys	Leu	Leu	Thr	Trp 330	Arg	Glu	Glu	Thr	Gly 335	Lys
Thr	Ala	Phe	Glu 340	Thr	Ala	Pro	Gln	Tyr 345	Glu	Gly	Lys	Ile	Gly 350	Glu	Gln
Glu	Tyr	Phe 355	Asp	Lys	Gly	Val	Leu 360	Met	Ile	Ala	Met	Val 365	Lys	Ala	Gly
Val	Glu 370	Leu	Ala	Phe	Glu	Thr 375	Met	Val	Asp	Ser	Gly 380	Ile	Ile	Glu	Glu
Ser 385	Ala	Tyr	Tyr	Glu	Ser 390	Leu	His	Glu	Leu	Pro 395	Leu	Ile	Ala	Asn	Thr 400
Ile	Ala	Arg	Lys	Arg 405	Leu	Tyr	Glu	Met	Asn 410	Val	Val	Ile	Ser	Asp 415	Thr
Ala	Glu	Tyr	Gly 420	Asn	Tyr	Leu	Phe	Ser 425	Tyr	Ala	Cys	Val	Pro 430	Leu	Leu
Lys	Pro	Phe 435	Met	Ala	Glu	Leu	Gln 440	Pro	Gly	Asp	Leu	Gly 445	Lys	Ala	Ile
Pro	Glu 450	Gly	Ala	Val	Asp	Asn 455	Gly	Gln	Leu	Arg	Asp 460	Val	Asn	Glu	Ala
Ile 465	Arg	Ser	His	Ala	Ile 470	Glu	Gln	Val	Gly	<b>Lys</b> 475	Lys	Leu	Arg	Gly	<b>Tyr</b> 480
Met	Thr	Asp	Met	Lys 485	Arg	Ile	Ala	Val	Ala 490	Gly					
<210 <211															

<212 <213			proted	bacte	erium l	N4-7									
<400>	> 64														
Met 1	Ala	Asn	Tyr	Phe 5	Asn	Thr	Leu	Ser	Leu 10	Arg	Asp	Lys	Leu	Thr 15	Gln
Leu	Gly	Lys	Cys 20	Arg	Phe	Met	Asp	Arg 25	Ser	Glu	Phe	Thr	Asp 30	Gly	Cys
Asp	Phe	Ile 35	Lys	Asp	Trp	Asn	Ile 40	Val	Ile	Ile	Gly	Cys 45	Gly	Ala	Gln
Gly	Leu 50	Asn	Gln	Gly	Leu	Asn 55	Met	Arg	Asp	Ser	Gly 60	Leu	Asn	Ile	Ser
Tyr 65	Ala	Leu	Arg	Ala	Gln 70	Ala	Ile	Ala	Glu	Lys 75	Arg	Gln	Ser	Phe	Val 80
Trp	Ala	Ser	Glu	Asn 85	Gly	Phe	Thr	Val	Gly 90	Thr	Ala	Glu	Glu	Leu 95	Val
Pro	Ala	Ala	Asp 100	Leu	Val	Leu	Asn	Leu 105	Thr	Pro	Asp	Lys	Gln 110	His	Thr
Ala	Ala	Val 115	Thr	Ala	Val	Met	Pro 120	Leu	Met	Lys	Gln	Gly 125	Ala	Thr	Leu
Ala	<b>Tyr</b> 130	Ser	His	Gly	Phe	Asn 135	Ile	Val	Glu	Glu	Gly 140	Met	Gln	Ile	Arg
Pro 145	-	Leu	Thr		Val 150		Val	Ala		Lys 155	-	Pro	Gly	Thr	Glu 160
Val	Arg	Glu	Glu	Туг 165	Lys	Arg	Gly	Phe	Gly 170	Val	Pro	Thr	Leu	Ile 175	Ala
Val	His	Pro	Glu 180	Asn	Asp	Pro	Gln	Gly 185	Asn	Gly	His	Ala	Ile 190	Ala	Lys

Ala Tyr Ala Ser Ala Thr Gly Gly Asp Arg Ala Gly Val Leu Glu Ser 195 200 205

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

Leu 225	Cys	Gly	Met	Leu	Gln 230	Thr	Gly	Ala	Val	Leu 235	Gly	His	Gln	Gln	Leu 240
Ile	Asn	Leu	Gly	Val 245	Asp	Ala	Ala	Tyr	Ala 250	Arg	Lys	Leu	Ile	Gln 255	Tyr
Gly	Trp	Glu	Thr 260	Val	Thr	Glu	Gly	Leu 265	Lys	His	Gly	Gly	Ile 270	Thr	Asn
Met	Met	<b>Asp</b> 275	Arg	Leu	Ser	Asn	Pro 280	Ala	Lys	Ile	Lys	Ala 285	Phe	Asp	Met
Ser	Glu 290	Glu	Leu	Lys	Val	Thr 295	Leu	Arg	Pro	Leu	Phe 300	Glu	Lys	His	Met
Asp 305	Asp	Ile	Ile	Glu	Gly 310	Glu	Phe	Ser	His	Thr 315	Met	Met	Ile	Asp	Trp 320
Ala	Asn	Asp	Asp	Ala 325	Asn	Leu	Leu	Lys	Trp 330	Arg	Ala	Glu	Thr	Ala 335	Asp
Ser	Ser	Phe	Glu 340	Gln	Ala	Ala	Asp	Cys 345	Asp	Ile	Glu	Ile	Thr 350	Glu	Gln
Glu	Phe	Tyr 355	Asp	Lys	Gly	Ile	Туг 360	Leu	Val	Ala	Met	Ile 365	Lys	Ala	Gly
Val	Glu 370	Leu	Ala	Phe	Glu	Thr 375	Met	Val	Ala	Ser	Gly 380	Ile	Ile	Glu	Glu
Ser 385	Ala	Tyr	Tyr	Glu	Ser 390	Leu	His	Glu	Thr	Pro 395	Leu	Ile	Ala	Asn	Cys 400
Ile	Ala	Arg	Asn	Lys 405	Leu	Tyr	Glu	Met	Asn 410	Val	Val	Ile	Ser	Asp 415	Thr
Ala	Glu	Tyr	Gly 420	Asn	Tyr	Leu	Phe	Thr 425	His	Ala	Ala	Val	Pro 430	Leu	Leu
Gln	Ala	His 435	Ala	Ser	Ser	Leu	Thr 440	Leu	Glu	Glu	Leu	Gly 445	Gly	Gly	Leu
Ala	<b>Asp</b> 450	Ser	Ser	Asn	Ala	Val 455	Asp	Asn	Leu	Arg	Leu 460	Ile	Glu	Val	Asn
465				_	470	_				475	_	His	Glu	Leu	Arg 480
СΤΆ	туr	меt	Thr	485	met	ьys	Arg	тте	Val 490	GLU	ALA	GТĀ			

<210> 65

<2112 <2122 <2132	> PF		omon	as ace	etoxida	ans									
<400>	> 65	;													
Met 1	Gly	Gln	Asn	Tyr 5	Phe	Asn	Thr	Leu	Ser 10	Met	Arg	Glu	Lys	Leu 15	Asp
Glu	Leu	Gly	Thr 20	Cys	Arg	Phe	Met	Asp 25	Ala	Ser	Glu	Phe	Ala 30	Gly	Gly
Cys	Glu	Tyr 35	Ala	Lys	Gly	Lys	Lys 40	Ile	Val	Ile	Val	Gly 45	Cys	Gly	Ala
Gln	Gly 50	Leu	Asn	Gln	Gly	Leu 55	Asn	Met	Arg	Asp	Ser 60	Gly	Leu	Asp	Val
Ser 65	Tyr	Thr	Leu	Arg	Lys 70	Glu	Ala	Ile	Ala	Glu 75	Lys	Arg	Gln	Ser	Tyr 80
Ile	Asn	Ala	Thr	Glu 85	Asn	Gly	Phe	Thr	Val 90	Gly	Ser	Tyr	Glu	Glu 95	Leu
Leu	Pro	Thr	Ala 100	Asp	Ile	Val	Met	Asn 105	Leu	Ala	Pro	Asp	Lys 110	Gln	His
Thr	Asp	Val 115	Val	Asn	Thr	Val	Val 120	Pro	Leu	Met	Lys	Gln 125	Gly	Ala	Thr
Phe	Ser 130	Tyr	Ala	His	Gly	Phe 135	Asn	Ile	Val	Glu	Glu 140	Gly	Thr	Ile	Ile
Arg 145	Lys	Asp	Leu	Thr	Val 150	Ile	Met	Val	Ala	Pro 155	Lys	Cys	Pro	Gly	Ser 160
Glu	Val	Arg	Ala	Glu 165	Tyr	Gln	Arg	Gly	Phe 170	Gly	Val	Pro	Thr	Leu 175	Ile
Ala	Val	His	Lys 180	Glu	Asn	Asp	Pro	Asn 185	Gly	Asp	Gly	Leu	Glu 190	Leu	Ala
Lys	Ala	Leu 195	Cys	Ser	Ala	Gln	Gly 200	Gly	Asp	Arg	Ala	Gly 205	Val	Leu	Glu

Ser	Ser 210	Phe	Val	Ala	Glu	Val 215	Lys	Ser	Asp	Leu	Met 220	Gly	Glu	Gln	Thr
Ile 225	Leu	Cys	Gly	Met	Leu 230	Gln	Ala	Gly	Ala	Leu 235	Leu	Cys	Phe	Asp	Lys 240
Met	Val	Glu	Asn	Gly 245	Ile	Glu	Ala	Pro	<b>Tyr</b> 250	Ala	Val	Lys	Leu	Ile 255	Gln
Tyr	Gly	Trp	Glu 260	Thr	Ile	Thr	Glu	Ala 265	Leu	Lys	His	Gly	Gly 270	Ile	Thr
Asn	Met	Met 275	Asp	Arg	Leu	Ser	Asn 280	Pro	Ala	Lys	Leu	Glu 285	Ala	Tyr	Glu
Leu	Ala 290	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu 295	Ile	Met	Arg	Pro	<b>Leu</b> 300	Phe	Arg	Lys	His
Met 305	Asp	Asp	Ile	Ile	Thr 310	Gly	Val	Phe	Ser	Ser 315	Thr	Met	Met	Glu	<b>Asp</b> 320
Trp	Ala	Asn	Asp	Asp 325	Ile	Asn	Leu	Leu	Thr 330	Trp	Arg	Glu	Gln	Thr 335	Gly
Gln	Thr	Ala	Phe 340	Glu	Lys	Thr	Glu	Ala 345	Ala	Gly	Glu	Ile	Ser 350	Glu	Gln
Glu	Tyr	Phe 355	Asp	Lys	Ala	Ile	<b>Leu</b> 360	Met	Val	Ala	Met	Val 365	Lys	Ala	Gly
Val	Glu 370	Leu	Ala	Phe	Glu	Ser 375	Met	Val	Glu	Val	Gly 380	Ile	Glu	Pro	Glu
Ser 385	Ala	Tyr	Tyr	Glu	Ser 390	Leu	His	Glu	Thr	Pro 395	Leu	Ile	Ala	Asn	Thr 400
Ile	Ala	Arg	Lys	Lys 405	Leu	Tyr	Glu	Met	Asn 410	Arg	Val	Ile	Ser	Asp 415	Thr
Ala	Glu	Tyr	Gly 420	Cys	Tyr	Leu	Phe	Ala 425	His	Ala	Cys	Val	Pro 430	Leu	Leu
Lys	Asp	Phe 435	Met	Ala	Ser	Val	Thr 440	Thr	Glu	Val	Ile	Gly 445	Lys	Gly	Leu
Asp	Asn	Val	Asp	Thr	Ser	Val	Asp	Asn	Ser	Thr	Leu	Val	Arg	Val	Asn

Ala 465	Asp	Ile	Arg	Ser	His 470	Tyr	Ile	Glu		Ile ( 475	∃ly G	3lu G	lu L		rg 80
Asp	Ala	Met	Gln	Gly 485	Met	Lys	Ala	Ile	Val 490						
<2102 <2112 <2122 <2132	> 58 > PF	1 RT	ativun	n											
<400	> 66														
Met 1	Ala	Ala	Val	Thr 5	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr 10	Ala	Ile	Ser	Ala	Ser 15	Ser
Lys	Thr	Leu	Ala 20	Lys	Pro	Val	Ala	Ala 25	Ser	Phe	Ala	Pro	Thr 30	Asn	Leu
Ser	Phe	Ser 35	Lys	Leu	Ser	Pro	Gln 40	Ser	Ile	Arg	Ala	Arg 45	Arg	Ser	Ile
Thr	Val 50	Gly	Ser	Ala	Leu	Gly 55	Ala	Thr	Lys	Val	Ser 60	Ala	Pro	Pro	Ala
Thr 65	His	Pro	Val	Ser	Leu 70	Asp	Phe	Glu	Thr	Ser 75	Val	Phe	Lys	Lys	Glu 80
Arg	Val	Asn	Leu	Ala 85	Gly	His	Glu	Glu	Tyr 90	Ile	Val	Arg	Gly	Gly 95	Arg
Asp	Leu	Phe	His 100	Leu	Leu	Pro	Asp	Ala 105		Lys	Gly	Ile	Lys 110	Gln	Ile
Gly	Val	Ile 115	Gly	Trp	Gly	Ser	Gln 120	Gly	Pro	Ala	Gln	Ala 125	Gln	Asn	Leu
Arg	<b>Asp</b> 130	Ser	Leu	Val	Glu	Ala 135		Ser	Asp	Ile	Val 140	Val	Lys	Val	Gly
Leu 145	Arg	Lys	Gly	Ser	Ser 150	Ser	Phe	Asn	Glu	Ala 155	Arg	Glu	Ala	Gly	Phe 160
Ser	Glu	Glu	Lys	Gly 165	Thr	Leu	Gly	Asp	Ile 170	_	Glu	Thr	Ile	Ser 175	Gly
Ser	Asp	Leu	Val	Leu	Leu	Leu	Ile	Ser	Asp	Ser	Ala	Gln	Ala	Asp	Asn

			180					185					190		
Tyr	Glu	<b>Lys</b> 195	Ile	Phe	Ser	His	Leu 200	Lys	Pro	Asn	Ser	Ile 205	Leu	Gly	Leu
Ser	His 210	Gly	Phe	Leu	Leu	Gly 215	His	Leu	Gln	Ser	Ile 220	Gly	Leu	Asp	Phe
Pro 225	Lys	Asn	Phe	Ser	Val 230	Ile	Ala	Val	Cys	Pro 235	Lys	Gly	Met	Gly	Pro 240
Ser	Val	Arg	Arg	Leu 245	Tyr	Val	Gln	Gly	Lys 250	Glu	Ile	Asn	Gly	Ala 255	Gly
Ile	Asn	Ser	Ser 260	Phe	Gly	Val	His	Gln 265	Asp	Val	Asp	Gly	Arg 270	Ala	Thr
Asn	Val	Ala 275	Leu	Gly	Trp	Ser	Val 280	Ala	Leu	Gly	Ser	Pro 285	Phe	Thr	Phe
Ala	Thr 290	Thr	Leu	Glu	Gln	Glu 295	Tyr	Lys	Ser	Asp	Ile 300	Phe	Gly	Glu	Arg
Gly 305	Ile	Leu	Leu	Gly	Ala 310	Val	His	Gly	Ile	<b>Val</b> 315	Glu	Ser	Leu	Phe	Arg 320
Arg	Tyr	Thr	Glu	<b>As</b> n 325	Gly	Met	Ser	Glu	Asp 330	Leu	Ala	Tyr	Lys	<b>As</b> n 335	Thr
Val	Glu	Ser	Ile 340	Thr	Gly	Val	Ile	Ser 345	Lys	Thr	Ile	Ser	Thr 350	Gln	Gly
Met	Leu	<b>Ala</b> 355	Val	Tyr	Asn	Ala	Leu 360	Ser	Glu	Asp	Gly	Lys 365	Lys	Glu	Phe
Glu	<b>Lys</b> 370	Ala	Tyr	Ser	Ala	<b>Ser</b> 375	Phe	Tyr	Pro	Cys	<b>Met</b> 380	Glu	Ile	Leu	Tyr
Glu 385	Cys	Tyr	Glu	Asp	Val 390	Ala	Ser	Gly	Ser	Glu 395	Ile	Arg	Ser	Val	Val 400
Leu	Ala	Gly	Arg	Arg 405	Phe	Tyr	Glu	Lys	Glu 410	Gly	Leu	Pro	Ala	Phe 415	Pro
Met	Gly	Lys	Ile 420	Asp	Gln	Thr	Arg	Met 425	Trp	Lys	Val	Gly	Glu 430	Arg	Val

Arg	Ser	Thr 435	Arg	Pro	Ala	Gly	Asp 440	Leu	Gly	Pro	Leu	Tyr 445	Pro	Phe	Thr
Ala	Gly 450	Val	Phe	Val	Ala	Met 455	Met	Met	Ala	Gln	Ile 460	Glu	Val	Leu	Arg
Lys 465	Lys	Gly	His	Ser	Tyr 470	Ser	Glu	Ile	Ile	Asn 475	Glu	Ser	Val	Ile	Glu 480
Ser	Val	Asp	Ser	Leu 485	Asn	Pro	Phe	Met	His 490	Ala	Arg	Gly	Val	Ser 495	Phe
Met	Val	Asp	Asn 500	Cys	Ser	Thr	Thr	<b>Ala</b> 505	Arg	Leu	Gly	Ser	Arg 510	Lys	Trp
Ala	Pro	<b>Arg</b> 515	Phe	Asp	Tyr	Ile	Leu 520	Thr	Gln	Gln	Ala	Leu 525	Val	Ala	Val
Asp	<b>Ser</b> 530	Gly	Ala	Pro	Ile	<b>As</b> n 535	Gln	Asp	Leu	Ile	Ser 540	Asn	Phe	Val	Ser
<b>Asp</b> 545	Pro	Val	His	Gly	Ala 550	Ile	Gln	Val	Cys	<b>Ala</b> 555	Glu	Leu	Arg	Pro	Thr 560
Leu	Asp	Ile	Ser	Val 565	Pro	Ala	Ala	Ala	<b>Asp</b> 570	Phe	Val	Arg	Pro	Glu 575	Leu
Arg	Gln	Cys	Ser 580	Asn											
<2102 <2112 <2122 <2132	> 33 > PF	8 RT	cia arti	ficial											
<220 <223		ıtante	KARI	3361	G8										
<400					00										
Met 1	Lys	Val	Phe	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Tyr	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala
Leu	Asn	Leu 35	Lys	Asp	Ser	Gly	Val 40	Asp	Val	Thr	Val	Gly 45	Leu	Tyr	Lys
Gly	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Lys	Ala	Glu	Ala	His	Gly	Phe	Lys	Val	Thr

Asp 65	Val	Ala	Ala	Ala	Val 70	Ala	Gly	Ala	Asp	Leu 75	Val	Met	Ile	Leu	I16 80
Pro	Asp	Glu	Phe	Gln 85	Ser	Gln	Leu	Tyr	Lys 90	Asn	Glu	Ile	Glu	Pro 95	Ası
Ile	Lys	Lys	Gly 100	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe 105	Ser	His	Gly	Phe	<b>A</b> la 110	Ile	His
Tyr	Asn	Gln 115	Val	Val	Pro	Arg	Ala 120	Asp	Leu	Asp	Val	Ile 125	Met	Ile	Ala
Pro	Lys 130	Ala	Pro	Gly	His	Thr 135	Val	Arg	Ser	Glu	Phe 140	Val	Lys	Gly	Gl
Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Ile	Tyr	Gln	<b>Asp</b> 155	Ala	Ser	Gly	Asn	Ala 160
Lys	Asn	Val	Ala	Leu 165	Ser	Tyr	Ala	Ala	Gly 170	Val	Gly	Gly	Gly	<b>A</b> rg 175	Th
Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	<b>Asp</b> 185	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Thr	Val	Glu	Leu 205	Val	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Ту
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Gl: 24
Gly	Gly	Ile	Ala	<b>As</b> n 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	ТУ
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Ala	Glu	Ser 270	Arg	Glı
Ala	Met	<b>Arg</b> 275	Asn	Ala	Leu	Lys	Arg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Ly
Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Ly

Arg Arg Asn Asn Ala Ala His Gly Ile Glu Ile Ile Gly Glu Gln Leu 305 310 Arg Ser Met Met Pro Trp Ile Gly Ala Asn Lys Ile Val Asp Lys Ala Lys Asn <210> 68 <211> 338 <212> PRT <213> secuencia artificial <220> <223> mutante KARI 2H10 Met Lys Val Phe Tyr Asp Lys Asp Cys Asp Leu Ser Ile Ile Gln Gly 10 Lys Lys Val Ala Ile Ile Gly Phe Gly Ser Gln Gly His Ala Gln Ala Leu Asn Leu Lys Asp Ser Gly Val Asp Val Thr Val Gly Leu Tyr Lys Gly Ala Ala Asp Ile Ala Lys Ala Glu Ala His Gly Phe Lys Val Thr 55 Asp Val Ala Ala Ala Val Ala Gly Ala Asp Leu Val Met Ile Leu Ile Pro Asp Glu Phe Gln Ser Gln Leu Tyr Lys Asn Glu Ile Glu Pro Asn 90 Ile Lys Lys Gly Ala Thr Leu Ala Phe Ser His Gly Phe Ala Ile His Tyr Asn Gln Val Val Pro Arg Ala Asp Leu Asp Val Ile Met Ile Ala 115 120 125 Pro Lys Ala Pro Gly His Thr Val Arg Ser Glu Phe Val Lys Gly Gly 130 Gly Ile Pro Asp Leu Ile Ala Ile Tyr Gln Asp Val Ser Gly Asn Ala 145 150 155

Lys Asn Val Ala Leu Ser Tyr Ala Ala Gly Val Gly Gly Arg Thr

				165					170					175	
Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	Asp 185	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Thr	Val	Glu	Leu 205	Val	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240
Gly	Gly	Ile	Ala	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	Ile 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	_
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Ala	Glu	Ser 270	Arg	Gln
Ala	Met	<b>Arg</b> 275	Asn	Ala	Leu	Lys	Arg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gly	Ile	Glu	Ile 315	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Gly	Ala	<b>Asn</b> 330	Lys	Ile	Val	Asp	<b>Lys</b> 335	Ala
Lys	Asn														
<210><211><211><212><213>	> 33 > PF	8 RT	ia arti	ficial											
<220> <223>		utante	KARI	1D2											
<400>	> 69														
Met 1	Lys	Val	Phe	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala

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

		275					280					285			
Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
<b>A</b> rg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	<b>A</b> la 310	His	Gly	Ile	Glu	Ile 315	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Gly	Ala	<b>A</b> sn 330	Lys	Ile	Val	Asp	Lys 335	Ala
Lys	Asn														
<210> 70 <211> 338 <212> PRT <213> secuencia artificial															
<220> <223>		utante	KARI	3F12											
<400>															
Met 1	Lys	Val	Phe	Tyr 5	Asp	Lys	Asp	Cys	Asp 10	Leu	Ser	Ile	Ile	Gln 15	Gly
Lys	Lys	Val	Ala 20	Ile	Ile	Gly	Phe	Gly 25	Ser	Gln	Gly	His	Ala 30	Gln	Ala
Leu	Asn	Leu 35	Lys	Asp	Ser	Gly	Val 40	Asp	Val	Thr	Val	Gly 45	Leu	Tyr	Lys
Gly	Ala 50	Ala	Asp	Ala	Ala	Lys 55	Ala	Glu	Ala	His	Gly 60	Phe	Lys	Val	Thr
Asp 65	Val	Ala	Ala	Ala	Val 70	Ala	Gly	Ala	Asp	Leu 75	Val	Met	Ile	Leu	Ile 80
Pro	Asp	Glu	Phe	Gln 85	Ser	Gln	Leu	Tyr	Lys 90	Asn	Glu	Ile	Glu	Pro 95	Asn
Ile	Lys	Lys	Gly 100	Ala	Thr	Leu	Ala	Phe 105	Ser	His	Gly	Phe	Ala 110	Ile	His
Tyr	Asn	Gln 115	Val	Val	Pro	Arg	Ala 120	Asp	Leu	Asp	Val	Ile 125	Met	Ile	Ala
Pro	Lys 130	Ala	Pro	Gly	His	Thr 135	Val	Arg	Ser	Glu	Phe 140	Val	Lys	Gly	Gly

Gly 145	Ile	Pro	Asp	Leu	Ile 150	Ala	Ile	Tyr	Gln	<b>Asp</b> 155	Val	Ser	Gly	Asn	Ala 160
Lys	Asn	Val	Ala	Leu 165	Ser	Tyr	Ala	Ala	Gly 170	Val	Gly	Gly	Gly	Arg 175	Thr
Gly	Ile	Ile	Glu 180	Thr	Thr	Phe	Lys	<b>Asp</b> 185	Glu	Thr	Glu	Thr	Asp 190	Leu	Phe
Gly	Glu	Gln 195	Ala	Val	Leu	Cys	Gly 200	Gly	Thr	Val	Glu	Leu 205	Val	Lys	Ala
Gly	Phe 210	Glu	Thr	Leu	Val	Glu 215	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro 220	Glu	Met	Ala	Tyr
Phe 225	Glu	Cys	Leu	His	Glu 230	Leu	Lys	Leu	Ile	Val 235	Asp	Leu	Met	Tyr	Glu 240
Gly	Gly	Ile	Ala	Asn 245	Met	Asn	Tyr	Ser	11e 250	Ser	Asn	Asn	Ala	Glu 255	Tyr
Gly	Glu	Tyr	Val 260	Thr	Gly	Pro	Glu	Val 265	Ile	Asn	Ala	Glu	Ser 270	Arg	Gln
Ala	Met	<b>Arg</b> 275	Asn	Ala	Leu	Lys	Arg 280	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu 285	Tyr	Ala	Lys
Met	Phe 290	Ile	Ser	Glu	Gly	Ala 295	Thr	Gly	Tyr	Pro	Ser 300	Met	Thr	Ala	Lys
Arg 305	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala 310	His	Gly	Ile	Glu	Ile 315	Ile	Gly	Glu	Gln	Leu 320
Arg	Ser	Met	Met	Pro 325	Trp	Ile	Gly	Ala	<b>Asn</b> 330	Lys	Ile	Val	Asp	Lys 335	Ala
Lys	Asn														

#### **REIVINDICACIONES**

- 1. Una enzima cetol-ácido reductoisomerasa como se expone en la ID de SEC Nº: 17, en la que
- a) el resto 52 se muta; o
- b) los restos 47, 50 y 52 se mutan; o
- 5 c) el resto 52 y al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en 24, 33, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170 se mutan; o
  - d) los restos 47, 50, 52 y al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en 24, 33, 53, 61, 80, 115, 156, 165 y 170 se mutan; y
- en la que dicha enzima cetol-ácido reductoisomerasa en el que dicha enzima cetol-ácido reductoisomerasa tiene una preferencia por la unión NADH en lugar de por NADPH, y en donde dicha mutación es una sustitución de aminoácidos.
  - 2. La enzima cetol-ácido reductoisomerasa según la reivindicación 1, en la que el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, G, H, N y S.
  - 3. La enzima cetol-ácido reductoisomerasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que:
- a) el resto en la posición 47 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, F, G, I, L, N, P e Y;
  - b) el resto en la posición 50 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, E, F, G, M, N, V, W; y
- c) el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, 20 G, H, N y S.
  - 4. La enzima cetol-ácido reductoisomerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que:
  - a) el resto en la posición 156 tiene una sustitución de aminoácidos de V;
  - b) el resto en la posición 165 tiene una sustitución de aminoácido de M;
  - c) el resto en la posición 61 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
- d) el resto en la posición 170 tiene una sustitución de aminoácidos de A;
  - e) el resto en la posición 24 tiene una sustitución de aminoácidos de F;
  - f) el resto en la posición 33 tiene una sustitución de aminoácidos de L;
  - g) el resto en la posición 80 tiene una sustitución de aminoácidos de I;
  - h) el resto en la posición 115 tiene una sustitución de aminoácidos de L; y
- i) el resto en la posición 53 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, H, I,
   W
  - 5. La enzima cetol-ácido reductoisomerasa según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en la ID de SEC Nº: 29.
- 6. Una molécula de ácido nucleico que codifica la enzima cetol-ácido reductoisomerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
  - 7. Una célula recombinante que comprende la enzima cetol-ácido reductoisomerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
  - 8. Un procedimiento para la evolución de una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que une NADPH a una forma que utiliza NADH que comprende:
- a) proporcionar una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que utiliza NADPH que tiene una secuencia de aminoácidos nativa específica;
  - b) identificar un resto que conmuta el cofactor en la enzima de a) basado en la secuencia de aminoácidos de la enzima cetol-ácido reductoisomerasa Pseudomonas fluorescens como se expone en la ID de SEC Nº: 17 en la que el resto que conmuta el cofactor de la ID de SEC Nº: 17 se encuentra en la posición 52;

- c) crear una mutación en el resto que conmuta el cofactor identificado en b) para crear una enzima mutante en donde dicha enzima mutante une NADH.
- 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el resto en la posición 52 tiene una sustitución de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, C, D, G, H, N y S.
- 5 10. El procedimiento de la reivindicación 8 en el que la enzima cetol-ácido reductoisomerasa tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en la ID de SEC Nº: 29.
  - 11. Un procedimiento para la producción de isobutanol, que comprende:
  - a) proporcionar una célula anfitriona microbiana recombinante que comprende las siguientes constructos genéticos:
  - i) al menos un constructo genético que codifica una enzima acetolactato sintasa para la transformación de piruvato en acetolactato;
    - ii) al menos un constructo genético que codifica una enzima cetol-ácido reductoisomerasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
    - iii) al menos un constructo genético que codifica una acetohidroxiácido deshidratasa para la transformación de 2,3-dihidroxi-isovalerato en  $\alpha$ -ceto-isovalerato (ruta de la etapa c);
- iv) al menos un constructo genético que codifica una cetoácido descarboxilasa de de cadena ramificada, para la transformación de  $\alpha$ -cetoisovalerato en isobutiraldehido (ruta de la etapa d);
  - v) al menos un constructo genético que codifica una alcohol deshidrogenasa de cadena ramificada para la transformación de isobutiraldehido a isobutanol (ruta de la etapa e); y
  - b) cultivar la célula anfitriona de a) en condiciones donde se produce iso-butanol.
- 20 12. Un procedimiento para la evolución e identificación de una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que une NADPH a una forma que utiliza NADH que comprende:
  - a) proporcionar una enzima cetol-ácido reductoisomerasa que tiene la secuencia de aminoácidos de ID de SEC Nº: 17:
- b) identificar los restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos cuyas cadenas laterales están en cercana 25 proximidad a la adenosil 2'-fosfato de NADPH como objetivos de mutagénesis:
  - c) crear una biblioteca de enzimas cetol-ácido reductoisomerasa mutantes a partir de la enzima de la etapa a), que tienen una mutación en el resto 52; y
  - d) cribar la biblioteca de enzimas cetol-ácido reductoisomerasa mutantes de la etapa c) para identificar enzimas cetol-ácido reductoisomerasa mutantes que unen NADH.

30

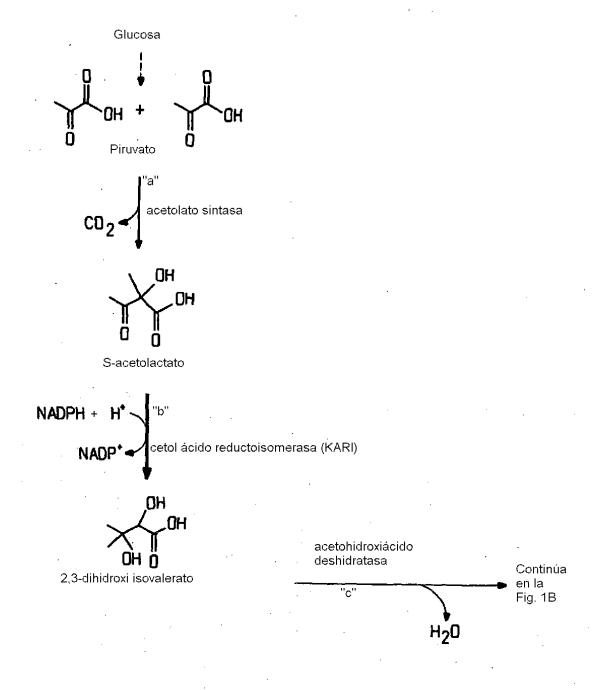
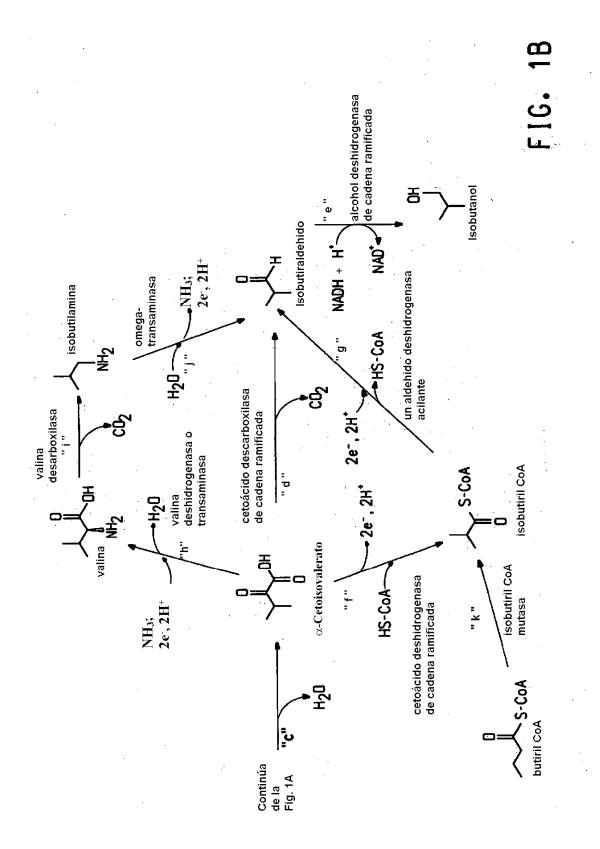


FIG. 1A



PF5 - KARI	(44) VGLRKGSATVAKA
PAO - KARI	(44) VGLRSGSATVAKA
Espinaca_KARI	(162) IGLRKGSNSFAEA
	FIG. 2A

	•	59 72
MMC5	(44)	VGLRKNGASWENAK
MMS2	(44)	VGLRK <b>NG</b> AS <b>W</b> NNAK
MVSB	(44)	VGLRKN <b>G</b> AS <b>W</b> ENAK
PF5-ilvC	(44)	VGLRKGSATVAKÆ
KARI-SI	(44)	VGLRKN <b>G</b> AS <b>W</b> NKAV
ilv5	(59)	IGVRKD <b>G</b> AS <b>W</b> KAAI
KARI-DI	(48)	VGLEREGKSWELAK
KARI-D2	(45)	IGLRRGGKSWELAT
Consenso	(59)	VGLRKNGASWE AK
	FI	G. 2B

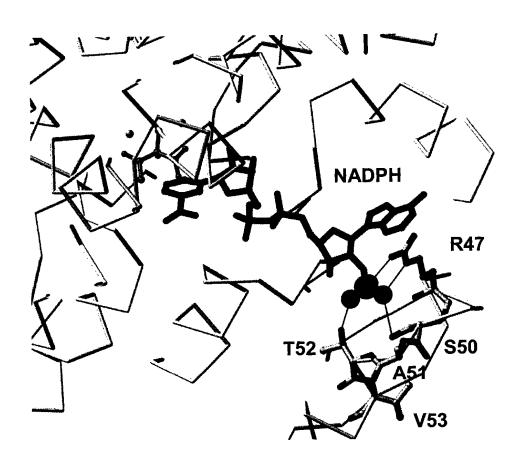
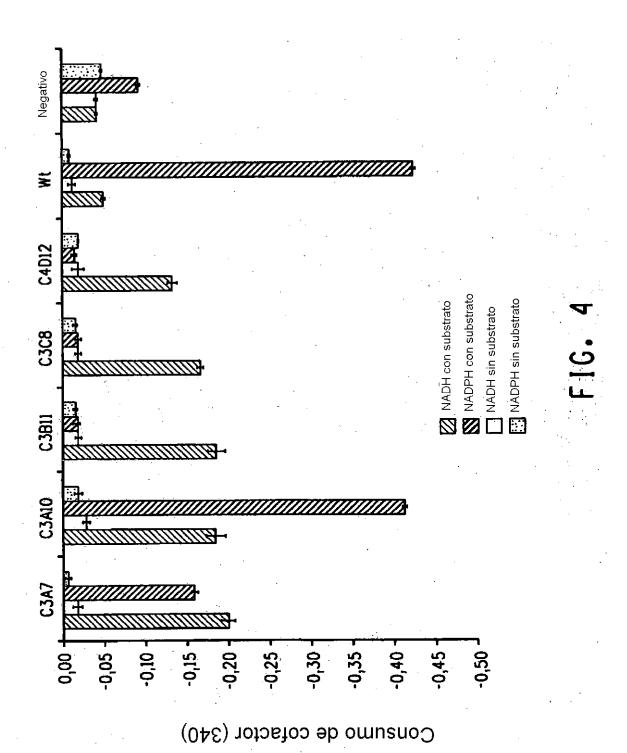
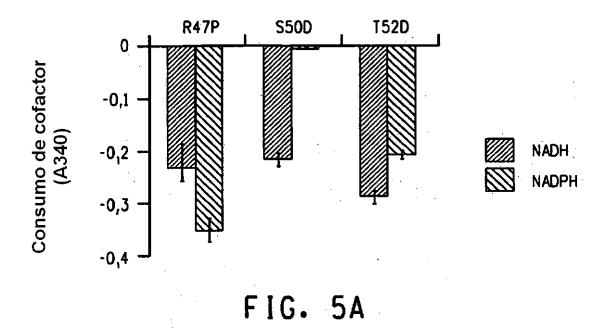
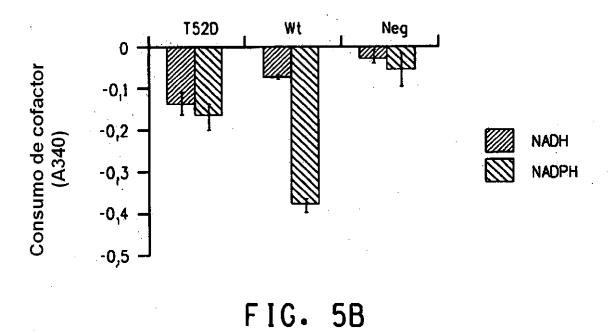


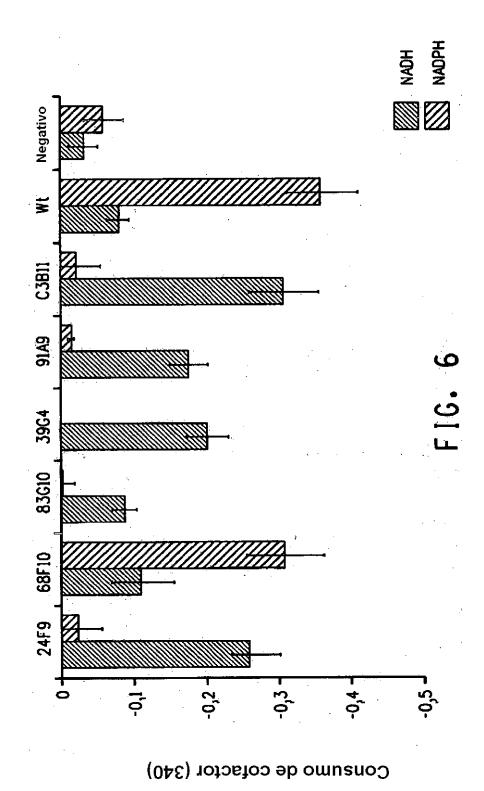
FIG. 3

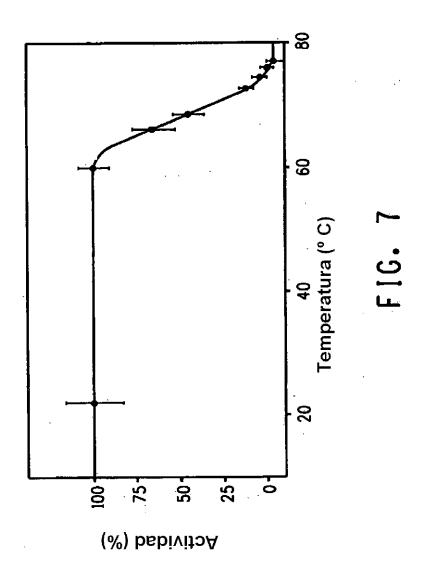






5B





ilvCl B cereus ilvC2 B cereus Espinaca KARI	(18) (17) (51)	100KKVAIIGKGSQGHAHAONLRDNGFDVVGLRKG-KSWDKAKTVAVIGKGSQGHAQAONLRDSGVEVVVGVRPG-KSFEVA FKGIKOIGVIGWGSQAPAQAONLKDSLTEAKSDVVVKIGLRKGSNSFAEA
PAO KARI PFS KARI	(71)	KKVA
ilvCl B cereus ilvC2 B cereus Espinaca KARI PAO KARI PF5 KARI	(56) (56) (101) (57) (57)	KEDGESVYTVAEAAKBADVVMIILPDELQPEVYEAEIAPNLQAGN KTDGEEVMSVSEAVRIAQVVQMILPDEQQAHVYKAGVEENLREGO RAAGESEENGTLGDMWETISGSDLVLLLISDSAQADNYEKVFSHMK-PNS EAHGIKVADVKTAVAAADVVMILTPDEFQGRLYKEEIEPNLKKGA EAHGIKVTDVAAAVAGAADLVMILTPDEFQSQLYKNEIEPNIKKGA
ilvC1 B cereus ilvC2 B cereus Espinaca KARI PAO KARI	(102) (101) (150) (102) (102)	151 SLVFAHGFNVHFDQVKPPANVDVFLVAPKGPGHLVRRTFSEG MLLFSHGFNIHFGQINPPSYVDVAMVAPKSPGHLVRRVFQEG ILGLSHGFLLGHLQSLGQDFPKNISVIAVCPKGMGPSVRRLYVQGKEVNG TLAFAHGFSIHYNQVVPRADLDVIMIAPKAPGHTVRSEFVKG TLAFSHGFAIHYNQVVPRADLDVIMIAPKAPGHTVRSEFVKG
ilvCl B cereus	(144)	201 GAVPALFAVYQDATGVATEKALSYADGIGATRAGVLETTFKEETETDLFG NGVPALVAVHODATGTALHVALAYAKGVGCTRAGVIETTFOEETETDLFG
Espinaca KARI PAO KARI	(200)	AGINSSFAVHODVDGRATDVALGWSIALGSPFTFATTLEQEYKSDIFG GGIPDLIAIYODASGNAKNVALSYACGVGGGRTGIIETTFKDETETDLFG GGIPDL. AIYODASGNAKNVALSYAAGAGGRTGIIETTFKDETETDLFG

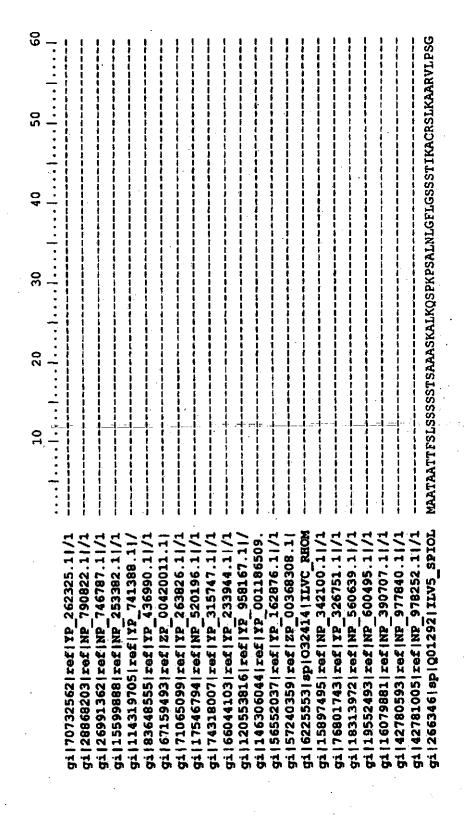


FIG. 9A

	70	80	90 100	110 120
1/11 305030 8013103306504115.				
7907		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	KVEYDKDCDLS	IIOG
q1 26991362 refine 746787.11/1	W		KVFYDKDCDLS	IIQG
gil15599888 refine 253382.11/1			RVFYDKDCDLS	II0G
gi 114319705 ref YP 741388.11/	W		QVYYDKDADLS	IIQG
gi 83648555 ref TP_436990.1 /1		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	QVYYDKDCDLS	II06
57159493 ref ZP_004		• • • • • • • • • • • • • • • • • • •	KVYYDKUCDLS	
g1   71065099   ref   YP_263826.1   /1			NVTYDKDCDLS	
g1[17546794]ret NP_520196.1.			KUVYDKDADI S	
ga   /431800/ rer ir 313/4/.4//			KVEVDKDCDI S	**************************************
gi becettos reristrativa de				
gril20553816 rer xP_95816/.11/				
gi 146306044 ref TP_001186509.		1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		
gi[56552037]ref[TP_162876.11/1				
gi [57240359 ref ZP_00368308.1			-AVSIIIDADCDIN	
g1 6225553 8P 032414 1LVC_KRUM			KCTSKIYTDNDANLD	LIKG
gi   76801743   ref  XP   326751.11/1			-TD-ATIYYDDDAEST	VLDD
qi 18313972 ref NP 560639.1 /1	<u> </u>		-AKIYTOREASLE	PLKG
di   19552493   ref   NP 600495.11/1	<u> </u>		-AIELLYDADADLS	L10G
dil16079881 ref NP 390707.1 /1	X		-VKVYYNGDIKEN	VLAG
gi   42780593   ref   NP 977840.11/1	<u> </u>		-AKVYYEKDVTVN	VLKE
gi 42781005 ref NP 978252.11/1	<del>2</del>		KTYYEKDANVE	TLKG
gi 266346 sp Q01292 ILW5_SPIOL	ANGGGSALSAC	VSAPSINTPSATT	angggsalsaqqysapsintpsattfdfdssvekkekvtlsghdeyivrggrnlfpllpd	DEYIVRGGRNLFPLLPD

FIG. 9B

	130 140 150 160 170 180
gi 70732562 ref YP_262325.1 /1 gi 28868203 ref WP_788822-1 /1	
di 126991362 (zer int. 746787.11/1	
qi 15599888 ref NP_253382.1 /1	1
gil114319705 xef YP 741388.11/	kkvavichcschahannikesgv-dwwgiregssaakackagia
gi 83648555 ref YP_436990.1 /1	CSHAHANNIKDS
gi 67159493 ref ZP_00420011.1	
gi   71065099  ref  XP 263826.11/1	
gi 17546794 ref NP_520196.1 /1	CHARAININDS
gi 74318007 ref YP_315747.1 /1	
gi 66044103 ref YP_233944.1 /1	OACINICAS
gi 120553816 ref YP 958167.1 /	AHACNIKDS
gill46306044 ref YP 001186509.	kkvaligygggggggagnikdsgv-dyfiglrkgsatvakaeahglk
gi 56552037 ref YP 162876.1 /1	kkiaiikargogarahagnirdsGvaevaialrpdsasvkkaodagfk
gil57240359 ref ZP_00368308.1	kkvaiigegssaamnirdscv-eviigikeggssaakaskanfi
gi   6225553   sp   032414   ILVC RROM	
g1 15897495 ref NP_342100.1 /1	
gi 76801743 ref YP_326751.1 /1	SCHAHACNIDOS
g1 18313972 ref NP_560639.1 /1	KTIAVIGYCHDCRADALNIRDSGL-EVIIGLRRGGKSWEIAITSEGFR
gi   19552493   ref   NP 600495.11 / 1	rkvalvgyggggggglgndrosgv-enviglregsksaekakeagfe
91 16079881   ref   NP 390707.11/1	KIVAVIGAGEDEHAHAINIKESGV-DVIVGVROGK-SFIGADEDGHK
	kkvaiigygbbghagnirdngf-dwwgirkgk-swokrkedgfs
qi 42781005 ref NP 978252.11/1	KIVAVICHGEDGHADAGNIRDSGV-EWWGVRPGK-SFEVAKTDGFE
91   266346   sp   Q01292   ILVS_SPIOL	AFKGIKQIGVIGMGBDAFHDAQNIKDSLTEAKSDV-VVKIGLRKGSNSFAEHRAAGFSEE
	GKGKX (G/A)

151

•	190	200	210	220	230	240
				· · · ·   · · · · ·		1 00,000
ហ	VTDVAAAVAGADLVMIITTEDE FOSOLYKNE I EPNIKKGAT LAF SAGFAI II INOVVFA	LVMILT FOEF	DSOLYKNEIE DSOLYKNEIE	PNIKKGATLA PNIKKGATLA	NAHLAGURYA I	ZVVER
28868203 ref NP_790822.1	VIDVASAVAAADLVMILLIANDE FUSKLIANBVEFNLANKSTATIAFSHGFSIHYNOVVPR	LVMILLI FIDER	DOZLINNEVE OGRI ÝKNETE	PNIKKGATIA	FSHGESIHYN	OVVPR
급 :	VADVALAVARADDVANJILTEDEFOGRLYKEEIEPNIKKGATLAFAHGFSIHYNQVVPR	VVM TLT FDE F	OGRLYKEEIE	PNLKKGATLA	NEAHGESTHYN	DVVPR
g1 155998881fer Nr_255554:11/	VASIEDAAAQADVVMILA PDEHQAVIYHNOIAPNVKPGAAIAFAHGFNIHFGOIQPA	VVMILAPDEH	QAVIYHNOIA	PNVKPGAAIA	NFAHGENIHEG	QIQPA
gilification   43690.11/1	VKEVAEAVAGADVVMILTHDEFQAQLYKSEIEPNIKSGATLAFAHGFSIHYNQIVPR	OVWNILT POEF	QAQLYKSEIE	PNLKSGATL	VEAHGESTHYN	OIVPR
gi   67159493   ref   ZP 00420011.1	VKSVKDAVAAADVVMIHTEEFOGRLYKDEIEPNLKKGATLAFAHGESIHYNOVVER	OVVM THAT FOE F	OGRLYKDETE	PNLKKGATL?	AFAHGESIHYN FRHOERTHYN	QVVPR
gi   71065099   ref   YP 263826.1   /1	VAEVEEAVKAADIIMIILTEDEFOKELYNDVIEPNIKOGAILAFANGFAINTINVIEN 	OI IMILL'EDEF	QKELYNDVIE Tanvyknevh	FNIKOGATLA	A FAHGENVHYG	AVIPR
gi 17546794 ref NP_520196.1 /1	THE VARIATION OF THE POST WAS TRUE TO SALVE THE THE TANGENT OF THE	TAME TO A STATE OF THE PARTY OF	OSRLYRDEIE	PNIKOGATLA	AFAHGESIHYN	QVVPR
gi 74318007 ref YP_315/4/.1 /1	VASVEBVAAADLVMIIITEDEFOSOLYKNEVEPNIKKGATLAFSHGFAIHYNQVVPR	OI VM ILT POE F	OSOLYKNEVE	PNLKKGATLA	AFSHGFAIHYN	QVVPR
dx   bb044103  tex   1r	TSDVASAVASADVVMVITHEDEFOAOLYREELEPNIKOGATLAFAHGFAIHYNOIVPR	OVVMVIAT FIDE F	<u>O</u> AOLYREEIE	PNLKQGATLA	<b>AFAHGFAIHYN</b>	QIVPR
gijizobbardireriri 	VIDVATAVAAADLVMILPPPEFQGQLYKQEIEPNIKKGATLAFSHGFAIHYNQVVPR	DLVMILTPDEF	OGOLYKOEIE	PNIKKGATL!	AFSHGFAIHYN	QVVPR
giltessessifetitetti.	VITNAEAAKWADILMILARDEHQAAIYAEDLKDNIRPGSAIAFAHGINIHFGLIEPR	DILMILARDEH	QAAIYAEDLK	ONIRPGSAL	AFAHGENIHEG	LIEPR
4113032237 Ltt 121 101368308.11	VKSVKEATKEADLIMILA POETOSET FNEETKPELKAGKTLAFAHGFNIHYGOIVAP	DLIMILAPOEI	QSEI FNEEIK	(PELKAGKTL)	afahgenihyg	QIVAP
41 57 5 5 5 3 1 5 5 1 4 1 ILVC RHOM	VITPAEAAAWADVVWIIJTPIDELQADLYKSELAANLKPGAALVFAHGLAIHFKLIEAR	<b>DVVMILLIPIDE</b> I	QADLYKSELP	ANLKPGAAL	VFAHGLAIHEK	LIEAR
91115897495 ref NP 342100.11/1	PLHTKDAVKDADIIIFILVFDMVQRTLWLESVQPYMKKGADLVFAHGFNIHYKLIDPP	отттецивому	QRTLWLESVC	PYMKKGADL	VFAHGENIHYK	LIDEP
di 176801743   ref   YP 326751.1   /1	VATPRGAAEQADLVSVLVPIDTVQPAVYE-QIEDVLQPGDTLQFAHGFNIHYGQIEPS	orvsvirveorv	QPAVYE-QIE	DVLQPGDTL	OFPHGENIHYG	QLEPS
gill8313972 refine 560639.11/1	VYEIGEAVRKADVILVULI POMEOPKVWOEQIAPNIKEGVVVDFAHGFNVHFGLIKPP	DVILVILI PIDME	QPKVWQEQI?	PNLKEGVVV	DEMIGENVHFG	LIKPP
4112522317eflNP 600495,11/1	vkttaeaaawadvimihahdhsqaeiftndiepninagdalifqhqinihfdlikpa	DVIMILAPIONS	<b>GAEIFTNDIE</b>	PNLNAGDAL	LFGHGLNIHFE	LIKPA
#1160708811##FIND 390707.11/1	VesvkeaaaqaeiimvilipdeqqqkvyeaeikdeltagksivfahgenvhfhqivPP	EIIMVLLPDEC	<b>QOKVYEAEI</b>	<b>CDELTAGKSE</b>	VEAHGENVHEE	QIVPP
41 100 2001 ECT NO 977840.11/1	VYTVAEAAKQADVVMIILEPPELQPEVYEAEIAPNLQAGNSLVFAHGENVHFDQVKPP	DVVMTLL PDE1	<b>OPEVYEAEI</b>	APNLOAGNSL	VERHGENVHFU	QVKPP
91142/303351251312_0314141	vmsvseavrtaqvvqmilippeqqahvykagveendregqmllfshgfnihfgqinpp	QVVQM11. PDEC	OAHVYKAGVI	SENTREGOME	LFSHGENIHEC	OINPP
<u> </u>	NGTLGDMWETISGSDLVLILISDSAQADNYE-KVFSHMKPNSILGLSHGFLLGHLOSLGO	DEVELLE SPS	ACADNYE-KVI	SHMKPNSIL	сга <mark>нс</mark> гілсні	OSIGO

## FIG. 9E

•	310	320	330	340	350	360
#11003325621#8£1XP 262325.11/1	GEGRAGIIETHER OFFE FOLKED AND GETVELVKAGFETLVERGYAPEMAKFECTHEL	l Prembiesebay	IOGETVELV	KAGFETLVEAG	YAPEMAYFEC	LHEL
di 288 68203   refine 790822.11/1	GCGRTGIIETTFKDETETDLEGEDAVLGGSTVELVKAGFETLVEAGYAPEMAKFECLHEL	ETETOLEGEDAV	ICCTVELV	KAGFETLVEAG	YAPEMAKFEC	THET
gi   26991362   ref   NP 746787.1   /1	GEGRIGII ETIFFKDEJFEJDLEGEDAVLGGSTVELVKAGFETLVEAGYAPEMAKFECLHEL	ELETOLEGEOAV	ICCTVELY	KAGFETLVEAG	XAPEMAKEEK	THET
g115599888 ref NP_253382.1 /1	GGGRTGIIETH FKOENEIDL FGEDAVLOGSCVELVKAGFETLVEAGYAPEMAKFECLHEL	<b>ETETOLEGEDAV</b>	LOGECVELV	KAGFETLVEAG	YAPEMAKEE	THEI
gii114319705 ref YP_741388.11/	SEGRAGVIETS FREETETITES SEDAVIDGEITSLIQAGFETIVE AGYAPEMAYFECIHET	ETETOL FGEDAV	udgeitsii	OAGFETLVEAG	YAPEMAKFE	LHET
gi 83648555 ref YP_436990.1 /1	SSGRTGIIETTFKOETETOLFGEDAVOGGAVELVKAGFETIVEAGYAPEMAKFECLHEL	ELETIDIL FIGEDAV	ICCCAVELY	KAGFETLVEAG	YAPEMAKFE	LHEL
gi 67159493 ref ZP_00420011.1	CEGRIGII ETT FROEDE TO FEDAVLOGECVELVRAGFETLVEAGYAPEMAKFECLHEL	ERETIDITEGEDAV	Idecoerv	KAGFETLVEAG	Xapemanfe(	THEI
gil71065099 ref YP 263826.11/1	SEGRSGIIENPEKDEPETDLEGEDAVIDGGAVELVKMGFETLTEAGYAPENAKFECLHEL	ZTETOLFGEDAV	<b>LCGGAVELY</b>	KMGFETLTEAG	YAPEMAYFE	THEI
qi 17546794 ref NP 520196.1 /1	GGGRAGIIENNFREETETETEEDAVEGGTVELIKAGFETLVEAGYAPEMAYFECLHEL	ETETION FIGEDAV	LCGCTVEL1	KAGFETLVEAG	<b>YAPEMAYFE</b> (	THEL
qi 74318007 ref YP 315747.1 /1	SEGRICI I EMPEKOENE NOL FICEDAVILOGISAVELVKAGFOTI VEAGYAPEMAKFECIHEL	erendi ecepav	LCGGAVELV	<b>KAGEDILVEA</b> G	<b>YAPEMA</b> YFE(	LHEL
q1   66044103   ref   YP 233944.1   /1	GEGRIGII ETIFFKOETE TOLFGEDAVILGGETVELVKAGFETLVEAGYAPEMAKFECLHEL	ETETIDILEGEDAV	LCGGTVELY	<b>KAGFETLVEAG</b>	YAPEMAYFE	LHEL
qi 120553816 ref TP 958167.11/	CEGRTGIIETTFKTETETETETAVTGGSAVELVKAGFETLTENGYAPENAKFECLHEL	ETETIDIL FIGEDAV	LCGRAVELY	<b>KAGFETLTEAG</b>	YA PEMAN FE	THET
gi 146306044 ref YP 001186509;	GEGRIGII ETH FKOETE TOLFGEDAVI COSTVELVKAGFETLVENGYAPENNY FECLHEL	ETETOL FGEDAV	IDECTVELY	KAGFETLVEAG	XAPEMANFE(	THEI
q1 56552037 ref TP 162876.11/1	CSGRSGVIENTEREEVENDLEGEDAVICESLIALITAGEETLTENGYAPEMAFFECMHEM	EVERIDIL FIGEDAV	ICCLTAL)	TAGEETLTEAG	XA PEMAFFE(	MHEM
gi 57240359 ref ZP 00368308.1	GEGRIGII ETH FKAETE HOLFEDAVILGELSALIQAGFETIVEAGYEPEMAKFECIHEM	ETETIOLEGEDAV	LICELSAL	QAGFETLVEAG	<b>YEPEMANFE</b>	THEM
gi   6225553   sp   032414   ILVC RHOM	CSGRSGIIENTEREFCETDIFFEDVVIDGELSKLIQYGFETLVENGYAPEMAYFECLHEV	<b>ECETIOL FGEDVV</b>	1CGCLSKL)	QYGFETLVEAG	<b>YAPEMAYFE</b>	THEY
gi 15897495 ref NP 342100.1 /1	CATRAGVI PHTFKEETETETETETETETVINAGIMELMRAAFETLVEETYOPEVAYFETINEL	ere roceseva	LVGCIMELA	RAAFETLVEEG	YOPEVAYFE	LINEL
gill6801743 xef YP 326751.1 /1	SCTRAGYVETITFREETETIOLFGEDAVILGGSVTSLVKTGYETLVDAGYSPEMAYFECLNEL	ETETION FICEDAV	TOCCATSTA	KTGXETLVDAG	YSPEMAYFE	CLNEL
gi 18313972   ref   NP 560639.1   / 1	CATRAGVIENT FREETE TO TOEDIVING CIMELIKK GFEVIVENGY OPEVAK FEVINEA	erenomiceory	LWGGLMEL	KKGFEVLVEMG	YOPEVAYEE	/LNEA
q1 19552493 ref(NP 600495.11/1	CBARAGVI HINFEAPITVIIDI FOEDAVILOOFIEELVKVGFEVLIEAGYEPEMAKFEVIHEL	ETVIDLEGEDAV	LOGGTEEL	<b>XVGFEVLTEAG</b>	YEPEMAYFE	/LHEL
g1 16079881 ref NP 390707.1 /1	GBARAGVIEHFFREEHEIDLFGEDAVILGGGLSALVKAGFETLTEAGYQPELAYFECLHEL	EFE TIDL FICEDAV	ICCELSALV	<b>RAGFETLTEAG</b>	YOPETHYFE	CLHEL
gi 42780593   ref   NP 977840.11/1	CATRAGVLENFEREPTETION FICEDAVILOGSVTALVKAGFETLVDAGYQPETAYFECLHEL	ETETOLEGEDAV	LCCOTAL	/KAGFETLVDAG	захипааох	CLHEL
g1 42781005 ref NP_978252.1 /1	GLTRAGVIENTFOEFIENDLEGEDTWICGSVTALVKAGFETLTEGGYRPETAKFECLHEL	ehendurkebrv	LCCCVTAL	<b>TKAGFETLTEGG</b>	YRPETAKFE	CLHEL
di  266346 sp 001292 ILW5 SPIOL	GBPF~~TFAITHLEGEVKSDI FGERGILIGAVHGIVECLFRRYTESGMSEDLAYKNIVECI	EYKSDI FGERGI	LLCAVHGIV	ECL FRRYTESG	MSEDIAKK	<b>LVECI</b>

FIG. 9F

	370	380		390	400	410	420
91170732562 ref YP 262325.11/1	K-LIVDLMYEGGIANMNYSISNNAEYGEYVTGPEVINAESRQAMRNALKRIQDGEYAKMF	TANMNYST	SNNAEYGE	YVIGPEVI	NAESRQAMR	NALKRIODGE	YAKME
gi 28868203 ref NP_790822.1 /1 H	K-LIVDLMYEGGIANMNYSISNNAEYGEYVTGPEVINAESRQAMRNALKRIQDGEYAKMF	TANMINIST	SNNAEYGE	YVTGPEVI	NAESROAMR	nalkriodg <mark>e</mark>	YAKME
gi   26991362   ref   NP 746787.1   /1	K-LIVDLMYEGGIANMNYSISNNAEYGEYVIGPEVINEESRKAMRNALKRIQDGEYAKMF	TANMNAST:	SNNAEYGI	SYVIGPEVI	NEESRKAMR	NALKRIODGE	YAKME
gil15599888 ref NP_253382.1 /1	K-LIVDLMYEGGIANMNYSISNNAEYGEYVIGPEVINAESRAAMRNALKRIQDGEYAKMF	TANMNYST:	SNNAEYGI	XVTGPEVI	NAESRAAMR	NALKRIODGE	YAKME
gil114319705 ref YP 741388.11/	K-LIVDLLYOGGIANMRYSISNTAEYGDFTRGPRVINEESREAMREILAEIQEGEFAREF	TANMRYST:	SNTAEYG	<b>SETRGPRVI</b>	NEESREAMR	EILAEIQEGE	FAREF
g1 83648555 ref YP 436990.1 /1	K-LIVDLMYEGGIANMNYSISNNAEYGEYVTGPEVINDOSRAAMRNALKRIQUGEYAKMF	TANMNYST	SNNAEYG	SYVTGPEVÎ	NDOSRAAMR	NALKRIODGE	YAKME
gil 67159493 ref ZP 00420011.1	K-LIVDLMFEGGIANMNYSISNNAEYGEYVIGPEVINEOSROAMRNALKRIODGEYAKMF	TANMNYST:	SNNAEYG	SYVIGPEVI	NEOSROAMR	NALKRIODGE	YAKME
qi 71065099 ref YP 263826.1 /1	K-LIVDLMYEGGIADMNYSISNNAEYGEYVTGPEVINEOSREAMRNALKRIOSGEYAKMF	TADMNYST	SNNAEYG	SYVTGPEVI	NEOSREAMR	NALKRIQSGE	YAKME
qi 17546794 ref NP 520196.1 /1	K-LIVDLIYEGGIGNMNYSISNNAEYGEYVIGPRVVIAETKOAMKOCLHDIQTGEYAKSF	<b>JIGNMNYST</b>	SNNAEYG	SYVIGERVV	TAETKQAMK	OCLHDIQTGE	YAKSE
q1 74318007 ref YP 315747.1 /1	K-LIVDLMYEGGIANMNYSISNNAEYGEYVTGVKVINEQSRAAMKECLANIONGAYAKRF	TANMNYST	SNNAEYG	SYVTGVKVI	NEQSRAAMK	ECLANIONG	YAKRE
di   66044103   ref   YP 233944.1   /1	K-LIVDLMYEGGIANMNYSISNNAEYGEYVTGPEVINAESROAMRNALKRIODGEYAKMF	<b>TANMNYST</b>	SNNAEYG	SYVIGPEVI	NAESROAMR	NALKRIODGE	YAKME
qi 120553816 ref TP 958167.11/	K-LIVDLMYEGGIANMNYSISNNAEYGEYVTGPEVINEOSREAMRNALKRIOSGEYAKMF	TANMNAST	SNNAEYG	SYVIGPEVI	NEOSREAMR	NALKRIOSGE	YAKME
qi 146306044 ref TP 001186509.	K-LIVDLMYEGGIANMNYSISNNAEYGEYVTGPEVINEESRKAMRNALKRIODGEYAKMF	TANMNYST	SNNAEYG	SYVTGPEVI	NEESRKAMR	NALKRIODGE	YAKME
q1156552037 ref YP 162876.1 /1	K-LIVDLIYEAGIANMRYSISNTAEYGDIVSGPRVINEESKKAMKAILDDIQSGRFVSKF	TANMRYST	SNTAEYG	DIVSGPRVI	NEESKKAMK	AILDDIQSGR	EVSKF
qi 57240359 ref ZP 00368308.1}	K-LIVDLIYQQQIADMRYSVSNTAEYGDYITGPKIITKETKEAMKGVLKDIQNGSFAKDF	<b>TADMRYSV</b>	SNTAEYG	DYITCPKII	TKETKEAMK	GVLKDIQNGS	FAKDE
G116225553  sp   032414   ILVC RHOM	K-LIVOLIYEGGIANMRYSISNTAEYGDYVTGSRIITEATKAEMKRVLADIQSGRFVRDW	<b>TANMRYST</b>	SNTAEYG	DYVTGSRII	TEATKAEMK	RVLADIOSER	EVRDW
q1 15897495 ref NP 342100.11/1	K-MLVDLVYENGISGMLKAVSDTAKYGGMTVGKFVIDESVRKRMKEALQRIKSGKFAEEW	SEMLKAV	SDTAKYG	SMTVGKFVI	DESVRKRMK	EALORIKSER	FAEEW
gil76801743 xef YP 326751.11/1	K-LIVDLMYEGGNSEMWDSVSDTAEYGGLTRGDRIVDDHAREKMEEVLEEVQNGTFAREW	<b>ENSEMWIST</b>	SDTAEYG	SLTRGDRIV	DDHAREKME	EVLEEVONG	FAREW
gi   18313972   ref   NP 560639.1   / 1	K-LIMDLIWORGIYGMLNGVSDTAKYGGLTVGPRVIDENVKRKMKEAAMRVKSGEFAKEW	STYGMLNGV	SDTAKYG	SLTVGPRVI	DENVKRKMK	EAAMRVKSGE	FAKEW
qi 19552493 ref NP 600495.1 /1	K-LIVDLMFEGGISNMWSWSDTAEFGGYLSGPRVIDADTKSRMKDILTDIQDGTFTKRL	CI SNAWYSV	SDTAEFG	SYLSGPRVI	DADTKSRMK	DILTDIQUE	FTKRL
q116079881 ref NP 390707.11/1	K-LIVDLMYERSTALAGMRYSISDTAQWGDFVSGPRVVDAKVKESMKEVLKDIQNGTFAKEW	<b>GLAGMRYSI</b>	SDTAQWG	DFVSGPRVV	DAKVKESMK	EVLKDIONG	FAKEW
qi 42780593 ref NP 977840.1 /1	K-LIVDLMYEGGLENMRYSVSDTAQWGDFVSGPRVVTEDTKKAMGTVLAEIQDGFFARGW	<b>CLENMRYSV</b>	SDTAQWG	DFVSGPRVV	TEDTKKAMG	TVLAETODG	FARGW
q1142781005 ref NP 978252.1 /1	K-LIVDIMYEGGLINMRHSISDIAEFGDYVIGSRIVIDEIKKEMKRVLIEIQQSEFAKKW	CL TNMRHST	SDTAEFG	DYVTGSRIV	TDETKKEMK	RVLTEIOOGE	FAKKW
g1 266346 sp Q01292 ILV5_SPIOL	TGVISKTISTROMLALYNSLSEEGKK-DFQAAYSASYYPSMDILYECYEDVASGBEIRSV	GMIALYNSE	SEEGKK-	DFQAAYSAS	YYPSMDILY	ECYEDVAS	EIRSV

	430	440	450	460	470	480
di   70732562   ref   YP 262325.11/1	ISEGATGYPSMTAKRRNNAAHGIE-IIGEOIRSMMFWIGANKIVDKAKN-	 KRRNNAAHGIE-	I IGEOLRISM	1  1PWIGANKIV	DKAKN	- <u> </u>
gi   28868203   ref   NP 790822.11/1	ITEGATGYPSMTAKRRNNAEHGIE-VIGEKIRSMMPWIAANKIVDKDKN-	KRRNNAEHGIE-	VICEKIRSM	4PWI AANKIV	JDKDKN	-
gi 26991362 ref NP_746787.1 /1		KRRNNAAHGIE-	IIDEOIBBM	<b>TPWISANKIV</b>	/DKTKN	-
gil15599888   ref   NP 253382.11/1	ITEGAANYPSMTAYRRNNAAHPIE-OIGEKIRAMPWIAANKIVDKSKN-	YRRNNAAHPIE	OIGEKTRAM	4PWIAANKI\	DKSKN	-
gi 114319705 ref YP 741388.1 / ci 83648555 ref YP 436990,11/1	VLENOAGCPTLTARRELAAEHETE-VVSERTREMMPMINANKLVUKURN TAEGAHNYPSMTAYRRNNAAHPTE-OVGEKTREMMPWIASNKIVOKSKN	RRRLAAEHEIE- YRBNNAAHPIE-	VVGERTREM OVGERTREM	MPWINANKLY MPWIASNKIY	DKSKN	
gi 67159493 ref ZP_00420011.1		YRRNNAAHQIE-	VVGEKLRIM	<b>HPWIAANKIN</b>	DKTKN	-
gi   71065099   ref   YP 263826.11 / 1	ISEGATNYP	SMTARRRNNAEHQIE-ITCAKIRGMMPWIGGNKIIDKDKN-	ITCAKIRGM	MPWIGGNKI	CDKDKN	1
gil17546794 ref NP_520196.11/1		RRRLTADHQIE-	OVGAKURAM	MPWIAKNKLY	/DQSKN	
gil74318007 ref YP_315747.1 /1	ilegoanyp	WRRNNAAHQIE-	VVGAKIRSM	MEWIAANKLY	/DHSKN	1 1 2
gi 66044103 ref YP_233944.1 /1	ISEGATGYP	SMTAKRRNNAAHGIE-IIGEKIRSMMPWIAANKIVDKDKN-	I IGEKIRSM	MPWIAANKI	/DKDKN	1
gi 120553816  ref  YP 958167.11/	ISEGALNYP	Smtarrqnaahete-tvgekirsmmpwisankivdkdkn-	TVGEKTRSM	MPWISANKI	/DKDKN	1
gi 146306044 ref YP_001186509.	ISEGATNYP	SMTAKRRNNAAHGIE-IIGEQIRSMMPHISANKIVDKTKN	I IGEOLESM	MPWISANKI	/DKTKN	! ! !
gi[56552037 ref YP_162876.1 /1		Elkaarkrmaahpie-Qugarirkmmpwiasnkludkarn-	OVGRRIPKM	MPWIASNKL	/DKARN	
gi 57240359 ref ZP_00368308.1}		ERKLMNDSLIE-	KTGREITAM	MPWISAKKE	/DKDKN	
gi   6225553  sp   032414   ILVC_RHOM		TRRICXEHVIE-	VVGERTRGM	<b>MANISKNKE</b>	/DKARN	1 1 1
gi 15897495 ref NP_342100.1 /1		GLSNVQNSLEE-	KIGNOLRDI	VQK	-GKPKS	
gi 76801743 ref YP_326751.1 /1		LRAAEKNHDIE-	AVGEDIRAL	FAW	-CDD	
gi[18313972]ref[NP_560639.1]/1		LMEEARTHPIE-	KVERENEKL	LFGP		
gi 19552493   ref   NP 600495.1   / 1		LRASYNNHPIE-	ETGAKIRDI	MSWVKVDAR	<b>AETA</b> -	1
gi 16079881 ref NP_390707.1 /1		INASENEHQIE-	VVGRKIREM	MPFVKQGKKI	CEAVVSVAON-	
gi (42780593)ref [NP 977840.1]/1		TNEKENEHEIE-	VVGRKIREM	MPFV-QPRVI	(VGMK	
gi 42781005 ref NP_978252.1 /1	ILENDAGRPTYNAMKKAEONHOLE-KVCAEIREMMSWIDAPKELVKK	MKKAEQNHOLE-	KVGAELREM	MSWIDAPKE	LVKK	
gi   266346  sp   Q01292   ILV5_SPIOL	VLAGRRFYEKEGLPAFPMGKIDQTRMWKVGEKVRSVRPAGDLGPLYPFTAGVYVAL	<b>FPMGKI DOTRM</b>	KVEEKVESV	RPAGD)	GPLYPFTAGV	YVAL

## FIG. 9H

	490 500 510 520 530 540
	- · · ·   · · · ·   · · · ·   · · · ·
gi   20/32322   1541   15	
gi   26991362   ref   NP 746787.1   /1	
gi 15599888 ref NP_253382.1 /1	
gill4319705 ref TP_741388.1 /	
gi 83648555 ref YP_436990.1 /1	
gi 67159493[ref ZP_00420011.1]	
gi 71065099 ref YP_263826.1 /1	
gill546794[ref]NP_520196.11/1	
gi 74318007 ref YP_315747.1 /1	
qi 66044103 ref YP 233944.1 /1	\$2E\$\$0\$00011U11111111111111111111111111111
gi 120553816 ref xP 958167.11/	\$
gi 146306044 ref XP_001186509.	
gi 56552037 ref TP 162876.1 /1	
gi 57240359 ref ZP_00368308.1	
gi   6225553   sp   032414   ILVC RHOM	
gi   15897495   ref   NP 342100.1   / 1	\$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$
g1   76801743   ref   YP 326751.1   /1	
gi 18313972 ref NP_560639.1 /1	
g1(19552493 ref NP_600495.1 /1	
gil16079881 ref NP_390707.11/1	
gi 42780593 ref NP_977840.1 /1	
gil 42781005 ref NP 978252.1 /1	MMADIETIERKEHSYSETINESVIEAVDSINPEMHARGVSFMVDNCSTTARLGSRKWADR

FIG. 91

	009 065 085 020 290
q1 70732562 ref TP 262325.1 /1	· · · ·   · · · ·   · · · ·   · · · ·
gi(28868203 refine_790822.11/1	
gi 25991362 rez NF_/46/6/.1 /1 gi 15599888 ref NF_253382.1 /1	
gill4319705 zef TP_741388.1 /	
gi 67159493 ref ze_450550:1 /1	
gi 71065099 ref XP 263826.1 /1	
gi 17546794 xef NP_520196.1 /1 ci 74318007 xef XP_315747.1 /1	
gi 66044103 xef YP 233944.1 /1	18222799999999999999999999999995
gi 120553816 ref YP 958167.1 /	
g1 146306044 ref TP_001186509.	
gi 56552037 xef TP_162876.1 /1	
g1(5/240359 rer 22_00365508.1{ d1 6225553 sp 032414 ILVC RHOM	
gi(15897495)zef(NP_342100.11/1	
gi 76801743 xef YP 326751.11/1	
gi   18313972   ref   NP   560639.1   / 1 qi   19552493   ref   NP   600495.1   / 1	
gi 16079881 ref NP_390707.1 /1	
gi 42780593 ref NP_977840.1 /1	
g:[266346 ap Q01292 ILV5_SPIOL	edtilsogalvavdngapinodlisnflsdpvheaigvcaqlrpsvdisvtadadfvrpe

IG. 9J

```
gi | 70732562 | xef | XP 262325.1|/1
gi | 28868203 | xef | NP 790822.1|/1
gi | 26991362 | xef | NP 746787.1|/1
gi | 1559988 | xef | NP 741388.1|/1
gi | 1559988 | xef | NP 741388.1|/1
gi | 1559988 | xef | XP 741388.1|/1
gi | 83648555 | xef | XP 741388.1|/1
gi | 83648555 | xef | XP 263826.1|/1
gi | 71065099 | xef | XP 263826.1|/1
gi | 74318007 | xef | XP 233944.1|/1
gi | 74318007 | xef | XP 233944.1|/1
gi | 74318007 | xef | XP 233944.1|/1
gi | 57240359 | xef | XP 233944.1|/1
gi | 5552037 | xef | XP 233944.1|/1
gi | 56552037 | xef | XP 32676.1|/1
gi | 56552037 | xef | XP 342100.1|/1
gi | 5655293 | xef | NP 342100.1|/1
gi | 15897495 | xef | NP 342100.1|/1
gi | 16079881 | xef | NP 560639.1|/1
gi | 42780593 | xef | NP 978252.1|/1
gi | 42781005 | xef | NP 978252.1|/1
```

gi |70732562 | ref | YP\_262325.1 | : dominio 1 de 1, desde 1 a 338: puntuación 926,8, E = 1e-270

37	82	45 46.	184
*->qwfafskvyyDbadlsghdeylikGRkVavIdYdSgGHAHAdNLrD M kV+YDbD+dls +1+GKkVA+IGYDSQGHA+A+NL+D -MKVFYDKDCDLSIIQGKKVAIIGYJSQGHAQACNLKD 37	SGVdV•VGIRKGSBSWakAeaaGfkVktvaEAvaqADvVmlillPDefQae SGVdV+VGIRKGSB++akAea+G+kV +va Ava+AD+Vmil+PDefQ++ SGVDVTVGIRKGSATVAKAEAHGIKVTDVAAAVAGADLVMIITPDEFQSQ	vYeeelepnikpgatlafAHGFNIHfgqivPrafFkDiDViMVAPKgPGH +Y++elepn+k+GatlaF+HGF+IH++q+vPra D+DViM+APK+PGH 88 LYKNEIBPNIKKGATLAFSHGFAIHYNQVVPRADLDVIMIAPKAPGH 134	tvrreyykgggvpallavyqdasgnakdlalsyakglgggragytefk tvr+a+vkggG+P+LiA+yqdasgnAk++AlsyA+g+GggR+G+Tettfk 135 tvrsefvkgggipdlalyqdasgnaknvalsyaagygggrtgiiettfk 184
਼ ਜ	ω (M	80	e C
			H
gi 7073256	91 7073256	gi 7073256	gi   7073256

185 DETETDLFGEQAVLCGGTVELVKAGFETLVEAGYAPEMAYFECLHELKLI 234

91 | 7073256

eETETDLFGEQaVLCGGvtelVkaGFETLVEaGYaPEMAYFECLHElKLI +ETETDLFGEQaVLCGG++eLVkaGFETLVEaGYaPEMAYFECLHElKLI

C	מַ
C	0
	_
•	
-	•
C	٥
L	<u>.</u>

VDLMYEGGIALMIYSiSdTAeYGdyvtGprVIdeeskeaMkevlkdiQsG VDLMYEGGIALM+ySiS++AeYG+yvtGp+VI++es++aM+++Lk+1Q+G 235 VDLMYEGGIANMYSISNNAEYGEYVTGPEVINAESRQAMRNALKRIQDG 284	efakewilEngadyPketltalrrneaeHqIEWkVGekLRammpWlaanK e+Ak++i+B++GyP ++ta rrn+a+H IE +Ge+LRsmmpWl anK 285 BYAKMFISEGATGYPSMTAKRRNNAAHGIB-IIGEQLRSMMPWIGANK 331	1vdkdkn<-* +vdk+kn 332 IVDKAKN 338
23.5	2 88 55	332
91   7073256	gi 7073256	g1   7073256