



УКРАЇНА

(19) UA (11) 93344 (13) C2
(51) МПК (2011.01)
C12Q 1/68
G01N 33/574

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ПОЛІМОРФІЗМ ЛЮДСЬКОГО ГЕНА NBS1 657del5, ЩО ВИКОРИСТОВУЄТЬСЯ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ УСПАДКОВАНОЇ СХИЛЬНОСТІ ДО РАКУ ПРОСТАТИ ЧИ ІНВАЗИВНОГО РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ДОЛЬКОВОГО ПІДТИПУ

1

2

(21) a200600302

(22) 14.06.2004

(24) 10.02.2011

(86) PCT/PL2004/000044, 14.06.2004

(31) P-360642

(32) 13.06.2003

(33) PL

(46) 10.02.2011, Бюл.№ 3, 2011 р.

(72) ЦИБУЛСКИ ЦЕЗАР, PL, ЛУБІНСКИ ЯН, PL, ГОРСКИ БОГДАН, PL, ГЛІНЕВІЧ БАРТЛОМЕЙ, PL, СІКОРСКИ АНДЖЕЙ, PL

(73) ПОМОРСКА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНА, PL, ЦИБУЛСКИ ЦЕЗАР, PL, ЛУБІНСКИ ЯН, PL, ГОРСКИ БОГДАН, PL, ГЛІНЕВІЧ БАРТЛОМЕЙ, PL, СІКОРСКИ АНДЖЕЙ, PL

(56) WO A 9955716, 04.11.1999

GORSKI BOHDAN ET AL: "GERMLINE 657DEL5 MUTATION IN THE NBS1 GENE IN BREAST CANCER PATIENTS" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 106, no. 3, 16 May 2003 (2003-05-16), pages 379-381

VARON R ET AL: "NIBRIN, A NOVEL DNA DOUBLE-STRAND BREAK REPAIR PROTEIN, IS MUTATED IN NIJMEGEN BREAKAGE SYNDROME" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 93, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 467-476

MASER RICHARD S ET AL: "An alternative mode of translation permits production of a variant NBS1 protein from the common Nijmegen breakage syndrome allele" NATURE GENETICS, vol. 27, no. 4, April 2001 (2001-04), pages 417-421

PLISIECKA-HALASA J ET AL: "Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) alterations and its protein (nibrin) expression in human ovarian tumours." ANNALS OF HUMAN GENETICS, vol. 66, no. 5-6, November 2002 (2002-11), pages 353-359

VARON R ET AL: "Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL)." CANCER RESEARCH. 1 MAY 2001, vol. 61, no. 9, 1 May 2001 (2001-05-01), pages 3570-3572

RESNICK IGOR B ET AL: "657del5 mutation in the gene for Nijmegen breakage syndrome (NBS1) in a cohort of Russian children with lymphoid tissue malignancies and controls." AMERICAN JOURNAL

OF MEDICAL GENETICS. 15 JUL 2003, vol. 120A, no. 2, 15 May 2003 (2003-05-15), pages 174-179

KANG JIAN ET AL: "Targeted disruption of NBS1 reveals its roles in mouse development and DNA repair" EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 21, no. 6, 15 March 2002 (2002-03-15), pages 1447-1455

CEROSALETTI KAREN M ET AL: "Retroviral expression of the NBS1 gene in cultured Nijmegen breakage syndrome cells restores normal radiation sensitivity and nuclear focus formation" MUTAGENESIS, vol. 15, no. 3, May 2000 (2000-05), pages 281-286

CYBULSKI C ET AL: "NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene." CANCER RESEARCH, vol. 64, no. 4, 15 February 2004 (2004-02-15), pages 1215-1219

(57) 1. Полінуклеотид, пов'язаний з підвищеною успадкованою схильністю до раку простати чи інвазивного раку молочної залози долькового підтипу, що кодує молекулярний варіант поліпептиду NBS1, де зазначений полінуклеотид містить делецію п'яти нуклеотидів, що відповідає позиції 18155, 18156, 18157, 18158 або 18159 гена NBS1 (657del5) (реєстраційний номер у Genbank: AB013139).

2. Полінуклеотид за п.1, який відрізняється тим, що результатом нуклеотидної делеції є змінена експресія варіанта гена NBS1 у порівнянні з відповідним геном дикого типу.

3. Вектор, що містить полінуклеотид за п.1 або 2.

4. Вектор за п.3, який відрізняється тим, що полінуклеотид функціональним чином зв'язаний з регуляторними послідовностями експресії, що дають можливість експресії в прокариотних або еукаріотних клітинах.

5. Клітина-хазяїн, одержана генно-інженерним шляхом, що містить полінуклеотид за п.1 або 2 або вектор за п.3 або 4.

6. Спосіб одержання молекулярного варіанта білка NBS1 або його фрагмента, пов'язаного з підвищеною успадкованою схильністю до раку простати чи інвазивного раку молочної залози долькового підтипу, при якому (а) культивують клітини-хазяїни за

(19) UA (11) 93344 (13) C2

п.5 і (б) виділяють зазначений білок чи фрагмент із культури.

7. Спосіб одержання клітин, здатних до експресії молекулярного варіанта гена NBS1, пов'язаного з підвищеною успадкованою схильністю до раку простати або інвазивного раку молочної залози долькового підтипу, що включає одержання генно-інженерним шляхом клітин, що містять полінуклеотид за п.1 або 2 або вектор за п.3 або 4.

8. Білок NBS1 або його фрагмент, пов'язаний з підвищеною успадкованою схильністю до раку простати або інвазивного раку молочної залози долькового підтипу, що кодується полінуклеотидом за п.1 або 2 або одержаний способом за п.6 або з клітин, одержаних способом за п.7.

9. Антитіло, що специфічно зв'язується з білком за п.8.

10. Антитіло за п.9, що специфічно розпізнає епітоп, що містить амінокислотні заміни, як вони визначені в п.1 або 2.

11. Молекула нуклеїнової кислоти, комплементарна полінуклеотиду за п.1 або 2.

12. Молекула нуклеїнової кислоти, здатна до специфічного розпізнавання і розщеплення полінуклеотиду за п.1 або 2.

13. Вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти за п.11 або 12.

14. Трансгенна тварина, яка не відноситься до людини, що містить щонайменше один полінуклеотид за п.1 або 2 або вектор за п.3 або 4.

15. Трансгенна тварина, яка не відноситься до людини, за п.14, що додатково містить щонайменше одну інактивовану алель дикого типу гена NBS1.

16. Трансгенна тварина, яка не відноситься до людини, за п.14 або 15, що являє собою мишу чи пацюка.

17. Олігонуклеотид для генотипування індивідуальних алелей гена NBS1, який містить делецію п'яти нуклеотидів, що відповідає позиції 18155, 18156, 18157, 18158 або 18159.

18. Спосіб виявлення схильності до раку простати або інвазивного раку молочної залози долькового підтипу у суб'єкта, що включає (а) виявлення в біологічному зразку, взятому від суб'єкта, успадковані зміни 657del5 в послідовності гена NBS1, який **відрізняється** тим, що зазначена зміна спричиняє

втрату значення гена NBS1; і (б) пов'язування даної зміни з показником схильності до раку простати або інвазивного раку молочної залози долькового підтипу у суб'єкта, в результаті чого виявлено дану схильність.

19. Спосіб за п.18, який **відрізняється** тим, що суб'єкт являє собою людину.

20. Спосіб за п.18, який **відрізняється** тим, що людина має слов'янське походження.

21. Спосіб за п.18, який **відрізняється** тим, що зміну виявляють за допомогою ПЛР з алель-специфічними олігонуклеотидами (ASO-ПЛР), аналізів на виявлення поліморфізму одониткової конформації (SSCP), прямого секвенування, алель-специфічної ампліфікації (ASA), мікрочіпів або ПЛР із використанням поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (RFLP-ПЛР).

22. Спосіб за п.18, який **відрізняється** тим, що біологічний зразок являє собою зразок тканини.

23. Спосіб за п.18, який **відрізняється** тим, що зразок тканини являє собою кров.

24. Спосіб за п.18, який **відрізняється** тим, що біологічний зразок містить лейкоцити.

25. Застосування успадкованої зміни 657del5 в послідовності гена NBS1 для виявлення успадкованої схильності до раку простати або інвазивного раку молочної залози долькового підтипу у суб'єкта.

26. Застосування за п.25, яке **відрізняється** тим, що суб'єкт являє собою людину.

27. Застосування за п.25, яке **відрізняється** тим, що людина має слов'янське походження.

28. Застосування за кожним із пп.25-27, який **відрізняється** тим, що наявність успадкованої зміни виявляють з використанням щонайменше одного з методів, вибраних з ASO-ПЛР, SSCP, мікрочіпів, прямого секвенування, ASA або RFLP-ПЛР.

29. Діагностичний набір для ідентифікації схильності до інвазивного раку молочної залози долькового підтипу або до раку простати у суб'єкта, що включає пакувальний матеріал і щонайменше два різних полінуклеотиди, що дозволяють ампліфікувати щонайменше частину гена, що містить мутацію 657del5NBS1, вибраний з групи Nbsex6f (SEQ ID NO:6), Nbsex6r (SEQ ID NO:7) і Nbsdel5 (SEQ ID NO:8).

Даний винахід відноситься, загалом, до засобів і способів діагностики та лікування успадкованої схильності до захворювань на рак, зокрема, до раку простати і/або дольковому інвазивному раку молочної залози, а також до використання успадкованих змін у гені NBS1 для діагностики цієї схильності. Зокрема, об'єкти винаходу дозволяють синтезувати фрагменти ДНК й ідентифікувати генномні аномалії, які пов'язані з підвищеною схильністю до згаданих видів раку.

Також, даний винахід відноситься до полінуклеотидів молекулярних варіантів гену NBS1, які пов'язані зі успадкованою схильністю до захворювань на рак простати і/або дольковий інвазивний рак молочної залози, а також до векторів, що міс-

тять такі варіанти (полінуклеотиди). Окрім того, цей винахід відноситься також до клітин-господарів, які містять такі варіанти або вектори, і до їх використання для продукування варіантів білку NBS1. Також, цей винахід відноситься і до варіантів білку NBS1 і до антитіл, які специфічно розпізнають такий білок. Винахід також стосується трансгенних тварин, які не є людиною, які містять вищенаведені варіанти, або вектори. Крім того, даний винахід відноситься до способів знаходження і виробництва ліків для терапії видів раку, які пов'язані з порушеннями функції гену NBS1. Згідно цього винаходу, крім того, запропоновано фармацевтичні і діагностичні композиції, які містять вищезазначені варіанти ДНК, вектори, білки, антиті-

ла та ліки, які можуть бути отримані вищенаведеними способами. Вказані композиції, зокрема, корисні для діагностики і лікування різних захворювань, а саме хвороб раку, ліками, які являють собою субстрати, інгібітори, або модулятори гену NBS1, або його продукту.

Деякі документи цитуються протягом всього тексту даного опису. Кожний з документів, згаданих тут (включаючи будь-які специфікації фірм-виробників, інструкції і т.і.), було включено у даний опис винаходу шляхом посилань, проте, не допускається, щоб будь-який згаданий документ дійсно являв собою попередній рівень техніки у відношенні даного винаходу.

Біохімічний шлях передачі сигналу ушкодження ДНК відіграє критичну роль у підтриманні цілості геному у відповідь на пошкодження ДНК і залучення у патогенез раку.

Індивідууми із рідкісними успадкованими рецесивними клінічними синдромами, такими як Ніймегенський синдром (NBS, Nijmegen breakage syndrome), синдром Блума, анемія Фанконі й атаксія-телеангіектазія (що характеризуються спонтанною хромосомною нестабільністю, імунodefіцитом і схильністю до раку), несуть мутацію в одному з генів біохімічного шляху передачі сигналу ушкодження ДНК (1, 2). Ген Ніймегенського синдрому локалізований на хромосомі 8q21 (3, див. також US6458534). Продукт гену NBS1 (нібрін, який також називається p95) являє собою компонент нуклеазного комплексу hMRE11/hRAD50/NBS1 (4). Цей комплекс є частиною BRCA1-асоційованого комплексу контролю геному (BASC, BRCA1-associated genome surveillance complex), який відповідає за репарацію пошкоджень ДНК (2). Делеція п'яти пар нуклеотидів у екзоні 6 NBS1 (657de15) є присутньою у більшості пацієнтів з NBS зі Східної Європи (5). Слід підкреслити, що вище згадані пацієнти є гомозиготними носіями мутації засновника Ніймегенського синдрому (алелі 657de15). Гетерозиготні носії мутацій NBS1 розповсюджені у Східній Європі (0,6% всього населення).

Не дивлячись на давні зусилля дослідників, що спрямовані на розробку способу діагностики підвищеної схильності до раку різної локалізації, потреба у таких діагностичних способах все ще залишається.

Відповідно, засоби і способи діагностики і, можливо, лікування підвищеної успадкованості до раку є все ще дуже бажаними.

Таким чином, технічним завданням даного винаходу є задоволення потреб, описаних вище.

Це технічне завдання вирішується пропонуванням об'єктів, які було охарактеризовано у формулі винаходу.

Даний винахід заснований на відкритті нової, до цих пір невідомої кореляції між однією з форм гену NBS1 і підвищеною успадкованою схильністю до деяких видів раку.

Несподівано, згідно винаходу, що визначений у формулі винаходу, з'ясовано, що ген NBS1 може відігравати роль у патогенезі раку простати (9) або інвазивної карциноми молочної залози долькового підтипу. Несподівано було встановлено, що гете-

розиготні носії мутації засновника Ніймегенського синдрому (аллель 657de15) можуть бути присутніми при підвищеному ризику раку, особливо раку простати і раку молочної залози.

На основі відкриття цього явища розроблено діагностичні тести і реагенти таких тестів для специфічного виявлення і генотипування алелів NBS1 у людей. Визначення алельного стану гену NBS1 у людей з використанням таких тестів може бути корисним для упередження або терапії різних захворювань, особливо раку, ліками, які являють собою субстрати, інгібітори або модулятори продукту гену NBS1.

Згідно першого перевтілення, у винаході запропоновані полінуклеотиди молекулярних варіантів гену NBS1, які корелюють із успадкованою схильністю до раку, зокрема, до раку простати або дольковому інвазивному раку молочної залози, і тих, що відносяться до них втілення винаходу, такі як вектори, клітини-господарі, варіанти білків NBS1 і способи їх отримання.

Згідно ще одного втілення винаходу, запропоновані способи ідентифікації і отримання ліків-кандидатів і модуляторів, таких як інгібітори NBS1, для терапії або попередження раку, а також способи діагностики стану таких розладів/схильності.

Згідно наступного втілення винаходу, запропоновані фармацевтичні і діагностичні композиції, які містять вищеописані полінуклеотиди, які містять їх вектори, білки, антитіла до них, а також ліки й інгібітори, які можуть бути отримані вищезгаданими методами.

Фармацевтичні і діагностичні композиції, способи і застосування винаходу корисні для діагностики і лікування/попередження успадкованої схильності до раку.

Виявлення варіацій у гені NBS1, які корелюють із успадкованою схильністю до раку, зокрема, до раку простати або дольковому інвазивному раку молочної залози, і діагностичні тести для розпізнавання різних алелів NBS1 у людських індивідуумів дають ефективний інструмент для удосконалення терапії і/або попередження раку.

Відповідно, винахід відноситься до полінуклеотиду, який пов'язаний з підвищеною успадкованою схильністю до раку, зокрема, до раку простати або інвазивного раку молочної залози долькового підтипу, до того ж цей полінуклеотид відібрано з групи, яка складається із: (а) полінуклеотиду, який має нуклеїново-кислотну послідовність будь-який з SEQ ID NO:., або (б) полінуклеотид, який кодує поліпептид, що має амінокислотну послідовність будь-який з SEQ ID:., або (в) полінуклеотид, що кодує молекулярний варіант поліпептиду NBS1, де вказаний полінуклеотид, який містить заміну нуклеотиду, делецію нуклеотиду, допоміжний нуклеотид або допоміжний нуклеотид і заміну нуклеотиду у положенні, що відповідає позиції 18155, 18156, 18157, 18158 або 18159 топу NBS1 (Genbank, реєстраційний номер: AB013139); (г) полінуклеотид, що кодує молекулярний варіант поліпептиду NBS1, де вказаний полінуклеотид містить делецію нуклеотиду в положенні, що відповідає позиції 18155, 18156, 18157, 18158 або 18159 гену NBS1 (Genbank, реєстраційний номер: AB013139); (д)

полінуклеотид, який кодує молекулярний варіант пептиду NBS1, де вказаний поліпептид містить делецію амінокислоти в положенні від 234 до 754 поліпептиду NBS1 (SEQ ID №: 2) і, можливо, як найменше, одну заміну відібрану із заміни Lys на Asn у позиції 219, Gin на Leu у позиції 220, Ile на Gin у позиції 221, Phe на Arg у позиції 222, Lys на Glu у позиції 223, Gly на Asn у позиції 224, Lys на Ile у позиції 225, Thr на Tyr у позиції 226, Phe на Ile у позиції 227, Ile на Phe у позиції 228, Phe на Glu у позиції 229, Leu на Cys у позиції 230, Asn на Gin у позиції 231, Ala на Thr у позиції 232, Lys на Ala у позиції 233 поліпептиду NBS1 (SEQ ID NO:2) і (е) полінуклеотид, який кодує молекулярний варіант поліпептиду NBS1, і має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4.

У контексті даного винаходу термін «молекулярний варіант» гену або білку NBS1, як його використовують тут, означає, що вказаний ген або білок NBS1 відрізняється від гену або білку NBS1 дикого типу (геномні послідовності гену NBS1, описані, наприклад, під реєстраційним номером AB013139) нуклеотидною(ними) заміною(ами), інсерцією(ями) і/або делецією(ями). Переважно результатом вказаної заміни нуклеотиду є присутність іншої амінокислоти в амінокислотній послідовності білку NBS1, передбаченим результатом якого є порушення функції цього білку.

Термін «відповідний», як його використовують тут, означає, що позиція визначається не тільки числом попередників нуклеотидів і амінокислот відповідно. Позиція нуклеотиду або амінокислоти, які можуть бути відсутніми, бути замінені або містити один чи більше ніж один додатковий нуклеотид, у відповідності з даним винаходом, може бути різною за рахунок делецій або додаткових нуклеотидів або амінокислот деінде в іншому місці гену або поліпептиду. Отже, під «відповідною позицією» згідно винаходу слід розуміти те, що нуклеотиди або амінокислоти можуть розрізнятися за вказаним номером, але можуть при цьому мати такі ж сусідні нуклеотиди або амінокислоти. Зазначені нуклеотиди або амінокислоти, які можуть бути замінені, бути відсутні або містити додаткові нуклеотиди або амінокислоти, також включені у термін «відповідні позиції». Такі нуклеотиди або амінокислоти можуть, наприклад, разом з їхніми сусідами утворювати послідовності, які можуть бути залучені у регуляцію експресії гену, стабільність відповідної РНК або сплайсингу РНК, а також кодувати функціональні домени або мотиви білку за винаходом.

У відповідності з даним винаходом генетичний варіант гену NBS1 досліджено шляхом аналізу послідовностей релевантних районів гену NBS1 людини. Добре відомим фактом є те, що геномна ДНК індивідумів, які несуть індивідуальну генетичну структуру всіх генів, включаючи NBS, може бути легко виділена з індивідуальних зразків крові. Потім ці індивідуальні зразки ДНК використовують для аналізу послідовності алелів гену NBS1, які є у індивідумі, що надав зразок крові. Аналіз послідовності можна проводити за допомогою ПЛР-ампліфікації релевантних районів гену NBS1, наступною очисткою продуктів ПЛР з наступним ав-

томатичним секвенуванням традиційними методами (циклічне секвенування з барвником на термінатор AB1).

Одним із важливих параметрів, які слід враховувати під час спроби визначення індивідуального генотипу NBS1 (і, можливо, ідентифікувати нові варіанти гену NBS1), є той факт, що кожна людина несе (за досить незначними аномальними виключеннями) дві копії гену NBS1 - два алелі NBS1 (діплоїдія), один успадкований від матері, а другий - від батька. У зв'язку з цим деякі індивідуми несуть мутацію тільки в одній копії (алелі) гену (гетерозиготні носії мутацій). Ці пацієнти здорові і не мають аномального фенотипу. Рідкісні індивідуми мають, навпаки, мутації в обох алелях (гомозиготні носії мутації NBS1). Вони уражені синдромом NBS, який характеризується фенотипічними аномаліями. Імунодефіцитом, а також схильністю до раку, передусім злоякісних пухлин лімфатичної системи. Слід зазначити, що даний винахід фокусується на виявленні схильності до раку серед гетерозиготних носіїв мутації NBS1. Прикладом мутації у гені NBS1, ідентифікованої як корелююча із успадкованою схильністю до раку, зокрема, раку простати або дольово-інвазивному раку молочної залози, відповідно з даним винаходом, є 657de15. Аналізи на мутації здійснюються з використанням стандартних методик і докладно описані в прикладах. Генетичне тестування варіабельності популяції відносно генетичних маркерів успадкованої схильності до раку пропонується як інструмент корисний для ідентифікації і відбору пацієнтів, які можуть мати таку схильність. Ця ідентифікація/відбір можуть ґрунтуватися на молекулярній діагностиці генетичного поліморфізму шляхом генотипування ДНК, яка виділена, наприклад, з лейкоцитів крові пацієнта, і визначення характеристики можливої схильності. Для фундаторів охорони здоров'я, таких як організації охорони здоров'я США і урядові служби охорони здоров'я багатьох європейських країн. Цей фармакогенетичний підхід може бути як засобом удосконалення охорони здоров'я, так і шляхом, який дозволяє зменшити витрати, оскільки терапія раку досить дорого коштує.

Результатом мутацій у варіантах генів NBS1 є амінокислотна(ні) делеція(ї), інерція(ї) і, зокрема, заміна(и) або відокремлено, або в сполученні. Звісно, можливо також створення таких мутацій генно-інженерним шляхом у генах дикого типу або в інших мутантних формах. Способи введення таких мутацій у послідовність ДНК гену NBS1 добре відомі спеціалістам у даній галузі, див., наприклад, Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y.

У найкращому перетворенні винаходу вищеписаний полінуклеотид кодує варіант білку NBS1 або його фермент, наприклад, такий що містить один або більше ніж один епітоп амінокислотної послідовності, яка кодується SEQ ID NO: 4.

Для дослідження природи змін в амінокислотній послідовності білку NBS1 можна використовувати комп'ютерні програми, такі як BRASMOL, які можна взяти в Інтернеті. Крім того, моделі збірки і комп'ютерну реконструкцію структурних мотивів

можна здійснити, використовуючи інші комп'ютерні програми які підходять (Olszewski, *Proteins* 25 (1996) @ 286-299; Hoffman, *Comput. Appl. Biosci.* 11 (1995), 675-679). Комп'ютери можна використовувати для конформаційного й енергетичного аналізу детальних білкових моделей (Monge, *J. Mol. Biol.* 247 (1995), 995-1012; Renouf, *Adv. Exp. Med. Biol.* 376 (1995), 37-45. Ці аналізи можна використовувати для ідентифікації впливу конкретної мутації на зв'язування і/або взаємодію з іншими складовими нуклеазного комплексу hMRE11/hRAD50/NBS1.

Зазвичай вказана амінокислотна делеція, вставка або заміна в амінокислотній послідовності білку, який кодується полінуклеотидом, за винаходом, є наслідком однієї чи більше нуклеотидних замін, інерцій, або делецій, чи будь-яких їх сполучень. Найкращим результатом вказаної нуклеотидної делеції, вставки або заміни є делеція амінокислоти у позиції від 234 до 754 поліпептиду NBS1 (SEQ ID NO:2) і, можливо, в крайньому разі, одна заміна амінокислоти, яка відібрана серед заміни Lys на Asn у позиції 219, Gin на Leu у позиції 220, Ile на Gin у позиції 221, Phe на Arg у позиції 222, Lys на Glu у позиції 223, Gly на Asn у позиції 224, Lys на Ile у позиції 225, Thr на Tyr у позиції 226, Phe на Ile у позиції 227, Ile на Phe у позиції 228, Phe на Glu у позиції 229, Leu на Cys у позиції 230, Asn на Gin у позиції 231, Ala на Thr у позиції 232, Lys на Ala у позиції 233 поліпептиду NBS1 (SEQ ID NO:2). Полінуклеотид, згідно з винаходом, може додатково містити одну, іншу ніж було вказано вище, нуклеотидну і, можливо, амінокислотну делецію, вставку і/або заміну, наприклад, делеції, вставки і заміни, що описані і відомі з рівня техніки. Втілення даного винаходу дає можливість дослідження синергетичних ефектів мутацій гену NBS1 у відношенні успадкованості схильності до захворювання на рак у пацієнтів, які не мають такі мутантні форми гену або подібні мутантні форми, які можна імітувати вище описаними білками. Очікують, що аналіз вказаних синергетичних ефектів забезпечить більш глибоке розуміння механізму виникнення успадкованої схильності до раку. На основі вказаного більш глибокого розуміння механізму виникнення успадкованої схильності до раку. На основі вказаного більш глибокого розуміння розробка діагностичних і фармацевтичних композицій, які відносяться до хвороб раку, значно вирає.

Ще більше варто уваги те, що при NBS-залежних видах раку відсутня функціональна копія гену (див. приклад 3: LOH). Таким чином, в раковій клітині залишається тільки мутантна копія. Тому, наприклад, інгібування мутантного алеля може привести до повної втрати білку NBS1 з клітини. Це повинно викликати загибель ракової клітини. Це є одним з можливих втілень терапевтичної мети даного винаходу.

Таким чином, перевага втілення даного винаходу відноситься до полінуклеотидів молекулярних варіантів гену NBS1, де результатом нуклеотидної делеції, вставки і/або заміни є видозміна експресії варіанту гену NBS1 порівняно із відповідним геном дикого типу.

Згідно даного винаходу, полінуклеотид може бути, наприклад, ДНК, кДНК, геномну ДНК, РНК чи отриману синтетичним шляхом ДНК або РНК, чи химерну молекулу нуклеїнової кислоти, яка продукується рекомбінантним шляхом, і містить будь-який з цих полінуклеотидів, чи то один, чи то у сполученні. Переважно вказаний полінуклеотид, є часткою вектору, зокрема, тою, що традиційно використовують у генетичній інженерії плазмід, космід, вірусів і бактеріофагів, які містять полінуклеотид згідно даного винаходу. Такі вектори можуть містити додаткові гени, наприклад, маркерні гени, які дають можливість селекції вказаного вектору у відній клітині-господаря і відповідних умовах.

В наступному переважному перевтіленні вектору, за даним винаходом, полінуклеотид функціональним чином пов'язаний з регуляторними послідовностями експресії які дають можливість експресії у прокаріотичних або еукаріотичних клітинах. Експресія вказаного полінуклеотиду включає транскрипцію цього полінуклеотиду, переважно у мРНК, яка транслюється.

Регуляторні елементи, які забезпечують експресію в еукаріотичних клітинах, переважно у клітинах ссавців, добре відомі спеціалістам даної галузі. Вони, зазвичай, містять регуляторні послідовності, які забезпечують ініціацію транскрипції і, можливо, полі-А сигнали, що забезпечують термінацію транскрипції і стабілізації транскрипту. Додаткові регуляторні елементи можуть включати як транскрипційні так і трансляційні енхансери. Можливі регуляторні елементи, які забезпечують експресію у прокаріотичних клітинах-господарях, включають, наприклад, lac, trp або tac промотор в *E. coli*, а прикладами регуляторних елементів, які забезпечують експресію в еукаріотичних господарях є промотор AOX1 або GAL1 у дріжджах чи CMV-, SV40-, RSV-промотор (вірусу саркоми Рауса), cMV-енхансер, SV40-енхансер, чи то глобіновий інтрон у клітинах ссавців й інших тварин. Окрім елементів, які відповідальні за ініціацію транскрипції, такі регуляторні елементи можуть також включати сигнали термінації транскрипції, такі як полі-А сайт SV40 чи полі-А сайт tk, "вниз за течією" від полінуклеотиду. Відповідні, у даному контексті, експресивні вектори відомі у цій галузі, вони являють собою, наприклад, експресивний вектор кДНК Okayama-Berg pCDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-vitrogen), pSPORT1 (GIBCO BRL). Переважно вказаний вектор являє собою експресивний вектор і/або вектор переносу чи направляючий вектор. Експресивні вектори отримані з вірусів, таких як ретровіруси, вірус віспаки, аденоасоційований вірус, віруси герпесу або вірус бичачої папіломи, можна використовувати для доставки полінуклеотидів або вектору, за винаходом, у популяцію клітин-мішеней. Для конструювання рекомбінантних вірусних векторів можна використовувати способи, добре відомі спеціалістам у даній галузі, див. наприклад, методики, описані у Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y., і у Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and

Wiley Interscience, N. Y. (1994). Або ж, полінуклеотиди і вектори, за винаходом, можна помістити у ліпосоми для доставки в клітини-мішені.

Даний винахід, крім того, відноситься до клітин-господарів, які трансформовані полінуклеотидом або вектором за винаходом. Така клітина-господар може являти собою прокаріотичну або еукаріотичну клітину, див. вище. Полінуклеотид чи вектор, за винаходом, який знаходиться у такій клітині-господарі, може бути чи інтегрованим у геном цієї клітини-господаря, чи може підтримуватися екстрахромосомно. У цьому відношенні також повинно бути зрозумілим, що рекомбінантну молекулу ДНК, за винаходом, можна використовувати для "направлення гену" і/або "заміщення гену", для відновлення мутантного гену чи для створення мутантного гену шляхом гомологічної рекомбінації, див., наприклад, Mouellic, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 4712-4716; Joyner, Gene Targeting, A Practical Approach, Oxford University Press.

Клітина-господар являє собою прокаріотичну чи еукаріотичну клітину, таку ж як клітина бактерій, комах, грибів, рослин, тварин чи людини. Перевагою клітин грибів є, наприклад, клітини грибів роду *Saccharomycetes*, зокрема, виду *S. cerevisiae*. Термін "прокаріотичний" означає той, який включає в себе всі бактерії, які можна трансформувати чи трансфіціювати полінуклеотидом для експресії варіанту білку NBS1 або його ферменту. Прокаріотичні господарі можуть включати в себе як грамнегативні, так і грампозитивні бактерії, такі як, наприклад, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* і *Bacillus subtilis*. Полінуклеотид, який кодує мутантну форму варіантів білків NBS1, можна використовувати для трансформації чи трансфекції господаря за допомогою будь-якої з методик, загально відомих звичайним спеціалістам у даній галузі. Способи отримання злитих, функціональних чином пов'язаних генів і їх експресії в бактеріальних або тваринних клітинах добре відомих у даній галузі знань (Sambrook, див. вище). Генетичні конструкції і способи, і/або були тут описані, можуть бути використані для здійснення експресії білків-варіантів NBS1, наприклад, у прокаріотичних господарів. В цілому, експресивні вектори, які вміщують промоторні послідовності, що сприяють ефективній транскрипції полінуклеотиду вставки, використовують разом із господарем. Експресивний вектор, зазвичай, містить точку початку реплікації, промотор і термінатор, а також специфічні гени, які здатні забезпечувати фенотипічну селекцію трансформованих клітин. Трансформованих прокаріотичних господарів можна вирощувати у ферментерах і культивувати за методиками, відомими у даній галузі для досягнення оптимального клітинного росту. Потім білки, за даним винаходом, можна виділити із середовища для росту, із клітинних лізатів або клітинних мембранних фракцій. Виділення і очистку поліпептидів за винаходом, які експресуються у мікробах або в інших організмах, можна здійснювати будь-якими традиційними способами, такими як, наприклад, розділення препаративною хроматографією, в яку залучено використання моноклональних чи поліклональних антитіл.

Таким чином, до наступного втілення винаходу відноситься спосіб отримання варіантів білків NBS1 і їхніх фрагментів, при цьому культивують клітину-господаря, як визначено вище, в умовах, які дають можливість експресії білку, і виділяють білок, який продукується, або його фрагменти з культури.

До іншого втілення винаходу відноситься спосіб отримання клітин, які здатні до експресії варіанту гену NBS1, що включає створення генно-інженерними методами клітин, які включають в себе полінуклеотид або с вектор за винаходом. Клітини, які були отримані за допомогою способу за даним винаходом, можна використовувати, наприклад, для тестування ліків способами, які описано D. L. Spector, R. D. Goldman, L. A. Leinwand, Cells, a Lab manual, CSH Press 1998. Крім того, ці клітини можна використовувати для дослідження відомих ліків і їх невідомих похідних на їх здатність до комплементзації розладів, викликаних мутаціями у гені NBS1 (наприклад, схильність до злоякісних утворень). Для цих втілень у клітинах-господарях переважно відсутній алель дикого типу, обидва алелі гену NBS1 і/або у меншості один і них такий, що пройшов мутації. Або ж сильну надекспресію алелю, що пройшов мутацію по відношенню до нормального алелю і порівняно з рекомбінантною експресуючою клітинною лінією, яка експресує нормальний алель на подібному рівні, можна використовувати в якості системи скринінгу і аналізу. Клітини, які можуть бути отримані вищенаведеними способом, можна також використовувати для скринінгу способами, які описано нижче.

Крім того, винахід відноситься до варіанту білку NBS1 або його фрагментам, які кодується поліпептидом за винаходом, чи отриманим вищеописаними способами, чи таким, що отримують з клітин, сконструйованих вищеописаним способом. У даному контексті також зрозуміло, що варіанти білків NBS1 згідно даного винаходу можна додатково модифікувати традиційними способами, які відомі у цій галузі. Із використанням варіантів білків NBS1 по цьому винаходу можна також визначити ділянки, релевантні за їх біологічною активністю або її інгібуванню, а саме за їх участю в утворенні правильного нуклеазного комплексу hMRE11/hRAD50/NBS1.

Даний винахід, в подальшому відноситься до антитіл, які специфічно розпізнають варіант білку NBS1 за винаходом. Переважно, це антитіло специфічно розпізнає епітоп, який містить одну або більше ніж одну амінокислотну заміну, як було описано вище. Антитіла проти варіанту білку NBS1 за винаходом чи його (синтезованого) фрагменту як антигену. Моноклональні антитіла можуть бути отримані, наприклад, за допомогою методик, які вперше були описані у Kohler and Milstein, Nature 256 (1975) 749-752, і Galfr6, Meth. Enzymol. 73 (1981) 93 і включають злиття клітин миєломи миші з клітинами селезінки, які було виділено з імунізованих тварин. Антитіла можуть представляти собою моноклональні антитіла, поліклональні антитіла або синтезовані антитіла, а також фрагменти антитіл, такі як Fab, Fv чи scFv фрагменти і т.і. Крім того, антитіла до вищенаведених поліпептидів або їх

фрагменти можуть бути отримані способами, які було описано, наприклад, у Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988.

Такі антитіла можна використовувати, наприклад, для імунопреципітації і імунолокалізації варіантів білків NBS1 за винаходом, а також для моніторингу на присутність таких варіантів білків NBS1, наприклад, у рекомбінантних організмах, а також для ідентифікації сполук, які взаємодіють з білками за даним винаходом. Наприклад, поверхневий резонанс плазмонний, який використовують у системі BIAcore, можна використовувати для підсилення ефективності фагових антитіл, які пов'язуються з епітопом білку за даним винаходом (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995) t 7-13). Крім того, даний винахід відноситься до молекул нуклеїнових кислот, які являють собою або містять комплементарну нитку будь-якого з вищеописаних полінуклеотидів або її частину, таким чином, мають відмінності як мінімум на один нуклеотид порівняно з відповідними нуклеотидними послідовностями гену NBS1 дикого типу, а саме маючи вищеописані нуклеотидні заміни, делеції і вставки. Така молекула може чи являти собою дезоксирибонуклеїнову кислоту, чи рибонуклеїнову кислоту. Такі молекули включають, наприклад, антизмистовну РНК.

Ці молекули можуть, крім того, бути зчепленими з послідовностями, які при транскрипції кодують рибосоми, продукуючи, таким чином, рибозим, який специфічно розщеплює транскрипти полінуклеотидів за даним винаходом. Крім того, даний винахід відноситься до вектору, який містить молекулу нуклеїнової кислоти за винаходом. Приклади таких векторів описано вище.

Переважно молекула нуклеїнової кислоти, присутня у векторі, функціональним чином зчеплена з регуляторними елементами, які дають можливість експресії у прокаріотичних або еукаріотичних клітинах-господарях; див. вище.

Даний винахід також стосується способу створення трансгенної тварини, не людини, переважно трансгенної миші, при якому вводять полінуклеотид або вектор за винаходом у зародкову клітину, ембріональну клітину, стоволову клітину або яйцеклітину або клітину, яка є похідною від них. Тварина, не людина, може бути використана у способі за винаходом, описаному нижче, і може являти собою не трансгенну здорову тварину, або може мати розлад, переважно розлад, який викликано як мінімум однією мутацією у гені NBS1. Такі трансгенні тварини добре підходять, наприклад, для фармакологічних досліджень ліків у зв'язку з варіантними формами вищеописаних варіантів білків NBS1, оскільки ці білки або в меншому ступені їх функціональні домени є консервативними між видами у вищих еукаріот, зокрема у ссавців. Отримання трансгенних ембріонів і їх скринінг можна здійснювати, наприклад, як описано A. L. Joyner Ed., Gene Targeting, A Practical Approach (1993), Oxford University Press. ДНК ембріонів можна аналізувати, проводячи, наприклад, Саузерн-блотінг з відповідним зондом.

Даний винахід також стосується трансгенних тварин, не людини, таких як, наприклад трансгенні миші, щури, хом'яки, собаки, мавпи, кролі, свині, *C. elegans* і риби, такі як, наприклад, електричні скати, які містять полінуклеотид чи вектор за винаходом, або отримані вищеописаним способом, переважно де вказаний полінуклеотид чи вектор стабільно інтегрований у геном вказаної тварини, не людиною, переважно таким чином, що у присутності вказаного полінуклеотиду чи вектору приводить до експресії варіанту білку MDR за винаходом. Тварина може мати одну або кілька копій цього чи інших нуклеотидів варіанта гену NBS1. Ця тварина може мати різне застосування, включаючи застосування як дослідну модель злогокісного процесу, отже є новою і цінною твариною при розробці шляхів терапії, лікування і т.і. захворювань, які викликані дефіцитом чи недостатністю правильної репарації пошкодженої ДНК у клітині. Відповідно, у даному випадку тварина переважно є лабораторною твариною, такою як миша або щур.

Трансгенна тварина, не людина, за винаходом додатково містить як мінімум один активований алель дикого типу гену NBS1. Розуміння цього дає можливість, наприклад, досліджувати взаємодію різних варіантних форм білків NBS1. Можливо, також, бажано інактивувати експресію або функцію гену NBS1 на визначеній стадії розвитку і/або життя цієї транс генної тварини. Це можна здійснити, наприклад, використовуючи тканина специфічні, регульовані розвитком і/або клітиною і/або індукційбельні промотори, що направляють експресію, наприклад, анти смислової РНК або рибосома, направленою проти транс крипту РНК гену NBS1; див. також вище. Підходящою індукційбельною системою є, наприклад, гена експресія, яка регулюється тетрацикліном, як описано, наприклад, Gossen and Bujard (Proc. Natl. Acad. Sci. 89 USA (1992) 5547-5551 і Gossen et al. (Trends Biotech. 12 (1994), 58-62). Подібним чином експресію варіанту гену NBS1 можна регулювати такими регуляторними елементами.

При наявності варіантів полінуклеотидів NBS1, а також білків і векторів за винаходом тепер можливо досліджувати *in vivo* у *in vitro* ефективність репарації пошкоджень ДНК у відношенні конкретних мутацій у гені NBS1.

Крім того, варіанти білків NBS1 можна використовувати для визначення фармакологічного профілю протипухлинних ліків і для ідентифікації і отримання додаткових ліків, які можуть бути більш ефективними для лікування раку, зокрема, для ослаблення деяких фенотипів, які викликані відповідними мутаціями, таким як описано вище.

Наступне втілення винаходу відноситься до способу ідентифікації і отримання модулятору NBS1, який здатний до модулювання активності молекулярного варіанту гену NBS1 або його генного продукту, при якому: (а) приводять у контакт білок за п.8 або клітину, що експресує молекулярний варіант гену NBS1, який містить полінуклеотид за п.1 чи 2., у присутності компонентів, здатних забезпечувати сигнал, який детектується у відповідь на активність білку NBS1, із сполученням, яке підлягає скринінгу, в умовах, які дають можливість

проявлення активності білку NBS1, і (б) визначають наявність або відсутність сигналу або зростання сигналу це є показником передбачуваного модулятора.

Термін "сполучення" у способі за винаходом включає одну речовину або безліч речовин, які можуть бути однаковими або різними.

Вказана(ні) сполука(ки) можуть бути синтезовані хімічним шляхом або продукуватися при ферментації мікроорганізмів, а також може міститися у зразках, наприклад, клітинних екстрактів, рослин, тварин чи мікроорганізмів. Крім того, вказані сполуки можуть бути відомими у даній галузі, але до цих пір не відомими як такі, що є корисними як інгібітори відповідно. Безліч сполук можна, наприклад, додавати у культуральне середовище або ін'єкувати ним клітину або тварину за винаходом, що не являє собою людину.

Якщо зразок, який містить (а) сполуку(и) ідентифікований у способі за винаходом, тоді можливо або виділити цю сполуку з вихідного зразка, який ідентифіковано як такий, що містить необхідну сполуку, або можна далі розділити вихідний зразок, наприклад, якщо він складається з багатьох різних сполук, так щоб зменшити число різних сполук на зразок, і повторити цей спосіб з частинами, які отримані розділенням вихідного зразку. Потім можна визначити чи проявляє вказаний зразок або сполука бажані властивості, наприклад, способами, які описані в даному документі або у літературі (Spector et al., Cells manual; див вище).

У залежності від складності зразків вищевказані стадії можна проводити кілька разів, переважно до тих пір, поки зразок, який ідентифіковано способом, за винаходом, не буде містити тільки обмежену кількість речовин або тільки одну речовину.

Зазвичай, вказаний зразок містить речовини з подібними хімічними і/або фізичними властивостями, і скоріше, вказані речовини подібні. Способи, за винаходом, можуть бути легко здійсненими і спланованими спеціалістом даної галузі, наприклад, з використанням інших аналізів на клітинній основі, які описано на рівні техніки, або шляхом використання і модифікацій, які описані у даному документі. Крім того, спеціаліст у даній галузі може легко зрозуміти, які додаткові сполуки і/або ферменти можна використовувати для здійснення способів за винаходом, наприклад, ферменти, якщо необхідно, які перетворюють якусь сполуку в його попередника, який, у свою чергу, є субстратом для білку NBS1. Така адаптація способу за винаходом, входить у компетенцію спеціаліста у даній галузі і може бути здійснена без зайвого експериментування.

Сполуки, які можна використовувати у відповідності з даним винаходом, включають пептиди, білки, нуклеїнові кислоти, антитіла, невеликі органічні сполуки, ліганди, пептидоміметики, РНК і таке інше. Способи отримання хімічних похідних і аналогів добре відомі спеціалістам у даній галузі і описані, наприклад, у Beilstein, Handbook of Organic Chemistry, Springer edition New York Inc., 175 Fifth Avenue, New York, N.Y. 10010 USA, і у Organic Synthesis, Wiley, New York, USA. Крім того,

вказані похідні і аналоги можна тестувати на їх ефекти способами, відомими у даній галузі або як описано у даному документі. Крім того, пептидоміметики і/або комп'ютерний дизайн похідних і аналогів відповідних ліків можна використовувати, наприклад, у способах, які описані нижче. Такі аналоги включають молекули, які мають у своїй основі структури відомих MDR-субстратів і/або інгібіторів і/або модуляторів, див. нижче.

Відповідні комп'ютерні програми можна використовувати для ідентифікації інтерактивних сайтів модулятора/інгібітора, що передбачений і білку NBS1 по винаходу за допомогою комп'ютерних програм пошуку комплементарних структурних мотивів (Fassina, Immunomethods 5 (1994), 114-120). Додаткові комп'ютерні системи, які підходять для комп'ютерного дизайну білків і пептидів описані в ріні техніки, наприклад, у Berry, Biochem. Soc. Trans. 22 (1994) 7 1033-1036; Wodak, Ann. N. Y. Acad. Sci. 501 (1987) 2 1-13; Pabo, Biochemistry 25 (1986), 5987. Результати отримані на основі вище описаного комп'ютерного аналізу, можна використовувати в поєднанні зі способом за даним винаходом, наприклад, для оптимізації відомих модуляторів/інгібіторів. Пептидоміметики які підходять та інші інгібітори можуть також бути ідентифіковані шляхом синтезу комбінаторних бібліотек пептидоміметиків за допомогою послідовної хімічної модифікації і тестування отриманих сполук, наприклад, зазначеними тут способами. Способи отримання та застосування комбінаторних бібліотек пептидоміметиків описані в ріні техніки, наприклад, у Ostresh, Methods in Enzymology 267 (1996), 220-234, та Domer, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 709. Крім того, для дизайну пептидоміметичних ліків можна використовувати трьохмірну і/або кристалографічну структуру інгібіторів і білку NBS1 за винаходом (Rose, Biochemistry 35 (1996), 12933-12944; Rutenber, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 1545-1558).

У стислому викладі цього винаходу запропоновані способи ідентифікації та отримання сполук, які можуть бути використані для лікування/попередження захворювання на рак.

В наступному втіленні даний винахід відноситься до способу ідентифікації і отримання модулятора NBS1, який здатен до модулювання активності молекулярного варіанту гену NBS1 або його генного продукту, при якому: (а) приводять до контакту білок за п.8 з першою молекулою, яка відома тим, що зв'язується білком NBS1, з утворенням першого комплексу, який містить зазначений білок та зазначену першу молекулу, (б) приводять у контакт зазначений перший комплекс із сполукою, що піддається скринінгу, і (в) вимірюють, чи витискає зазначена сполука зазначену першу молекулу із зазначеного першого комплексу.

Переважно, у даному способі зазначена стадія вимірювання включає вимірювання утворення другого комплексу зазначеного білку із зазначеною сполукою - кандидатом у модуляторі.

Переважно, зазначена стадія вимірювання включає в себе вимірювання кількості зазначеної першої молекули, яка не зв'язалась із зазначеним білком.

Крім того, переважно, щоб у способі винаходу, зазначена перша молекула була помічена, наприклад, радіоактивною або флуоресцентною міткою.

Ще в одному втіленні даний винахід відноситься до способу діагностики підвищеної успадкованої схильності до захворювань на рак, при якому (а) визначають присутність полінуклеотиду по винаходу у зразку, який взято від суб'єкту, і/або (б) визначають присутність варіантів білку NBS1, наприклад, з антитілом, за винаходом.

У відповідності з даним втіленням згідно даного винаходу, спосіб тестування стану успадкованої схильності до захворювання на рак можна здійснювати шляхом використання полінуклеотиду або молекули нуклеїнової кислоти, за винаходом, наприклад, у формі Саузерн або Норзерн-блотінгу або аналізу *in situ*. Зазначену послідовність нуклеїнової кислоти можна гібридувати з кодуючою ділянкою будь-якого з генів або з некодуючою ділянкою, наприклад, з інтроном. У випадку, коли комплементарну послідовність використовують у способі за винаходом, зазначену молекулу нуклеїнової кислоти можна знову використати у в Норзерн-блотінгах.

Крім того, показане тестування можна проводити у зв'язку з даним блокуванням, наприклад, вважається що транскрипція гену має терапевтичну релевантність.

Крім того, праймер або олігонуклеотид можна також використовувати для гібридизації з одним з вище згаданих генів NBS1 або відповідних м РНК. Нуклеїнові кислоти, які використовують для гібридизації. Зазвичай можуть бути для зручності мічені шляхом включення або приєднання, наприклад, радіоактивного чи іншого маркера. Такі маркери добре відомі в цій галузі.

Мічення вказаних молекул нуклеїнових кислот можна здійснювати традиційними способами.

Крім того, моніторинг наявності або експресії варіантів генів NBS1 можна здійснювати за використанням пари праймерів, які специфічно гібридуються з будь-якою із відповідних послідовностей нуклеїнової кислоти, і проводячи реакції ПЛР за стандартними методиками. Специфічна гібридизація вищезгаданих зондів або праймерів переважно відбувається у жорстких умовах гібридизації. Термін "жорсткі умови гібридизації" відомий у даній галузі, див., наприклад, Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual" second ed., CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989; "Nucleic Acid Hybridisation, A Practical Approach", Hames and Higgins eds., IRL Press, Oxford, 1985. Крім того, мРНК, кРНК, кДНК або геномну ДНК, яка отримана від суб'єкту, можна секвенувати для ідентифікації мутацій, які можуть бути характеристичними фінгерпринтами мутацій гену NBS1. Далі, даний винахід включає способи де такий фінгерпринт можна створити з використанням поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (RFLP) ДНК чи РНК, яка отримана від суб'єкта, можливо, ДНК або РНК можна ампліфікувати перед аналізом добре відомим у даній галузі. Отримати фінгерпринти РНК можна, наприклад, шляхом ферментативного гідролізу зразка РНК, який отримано від суб'єкта, ферментом що підходить для РНК, наприклад, РНКазою

Т1, РНКазою Т2 і т.і., або рибозимом, і, наприклад, електрофоретичним розділенням і детекцією фрагментів РНК як описано вище.

Подальші модифікації вищевизначеного втілення винаходу можуть бути легко зроблені спеціалістом у даній галузі без зайвого експериментування на основі даного опису винаходу; див., наприклад, приклади. Додаткове втілення даного винаходу відноситься до способу, в якому вказане визначення здійснюється за використанням антитіла або його ферменту, за винаходом. Антитіло, яке використовують у способі, за винаходом, може бути міченим мітками які детектуються, такими як, гістидинові "прапорці" або молекули біотину.

У кращому втіленні способу по дійсному винаході, вищеописані способи включають ПЛР, лігату ланцюгову реакцію, рестрикційний ферментативний гідроліз, пряме секвенування, методику ампліфікації нуклеїнових кислот, мікрочіпи, методи гібридизації або імунологічні аналізи (Sambrook et al., loc. cit. CSH cloning, Harlow and Lane loc. cit. CSH antibodies).

У кращому втіленні способу по дійсному винаході вказане захворювання на рак являє собою рак простати або інвазивний рак молочної залози долькового підтипу.

У кращому втіленні способу по дійсному винаході наступна стадія, даного винаходу, включає введення суб'єкту ліків, які для видалення або зменшення вказаного захворювання на рак.

У кращому втіленні способу по дійсному винаході, вказані ліки являють собою хімотерапевтичний агент, такий як адриаміцин, доксорубіцин, паклітаксол (таксол) та інші MDR-субстрати, Ambudkar SV. et al., Amu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39 (1999) 9 361. У кращому втіленні способу по дійсному винаході, вказаний спосіб додатково включає введення у клітину (i) функціонального і експресуемого гену NBS1 дикого типу або (ii) молекули нуклеїнової кислоти чи то вектора.

У даному контексті, а також як використовуюється по ходу всього винаходу, термін «функціональний» ген NBS1 означає ген, де білок що кодується має частину або всю первинну структурну конформацію білку NBS1 дикого типу, тобто має біологічні властивості участі у нуклеазному комплексі. hMRE11/hRAD50/NBS1 з правильною активністю. Дане втілення винаходу підходить для терапії/попередження раку. Виявлення експресії варіанту гену NBS1 дозволить зробити висновок, що вказана експресія взаємозв'язана зі схильністю або із підтримкою певного фенотипу раку. Відповідно. Ця стадія буде використовуватися для зниження рівня експресії до більш низьких рівнів або для зупинення експресії. Це можна зробити, наприклад, шляхом як мінімум часткової елімінації експресії мутагенного гену біологічними способами, наприклад, використовуючи ферменти, антисміслові молекули нуклеїнових кислот, внутрішньоклітинні антитіла або вищеописані інгібітори проти варіантних форм цих білків NBS1.

Крім того, можна розробити фармацевтичні продукти, які знижують рівень експресії відповідних білків і генів.

У наступному втіленні винахід відноситься до способу приготування фармацевтичної композиції, яка включає стадії будь якого з вищеописаних способів і стадій синтезу і/або включення у препарат сполуки, ідентифікованої на стадії (6). Або його похідної або гомолога у фармацевтично придатній формі.

Терапевтично корисні сполуки, ідентифіковані згідно способу за винаходом, можна включати у препарат і вводити пацієнту, як обговорюється вище. Застосування та терапевтичні дозування, які визначені спеціалістом у даній галузі, як придатні, див нижче.

Далі, даний винахід відноситься до способу приготування фармацевтичної композиції, що включає стадії будь якого з вищеописаних способів і стадій включення у препарат ліків або проліків у формі, яка придатна для терапевтичного застосування і попередження або ослаблення розладів у суб'єкта, якому проводили діагностику способом за винаходом.

Ліки або проліки після їх введення *in vivo* перетворюються на речовини в ході процесів обміну речовин з метою видалення чи то шляхом виділення, чи то шляхом перетворення в один або більше активних чи не активних метаболітів (Meyer, J. Pharmacokinet. Biopharm. 24 (1996), 449-459). Отже, замість самої сполуки чи інгібітору, ідентифікованого і отриманого способами за даним винаходом, скоріш за все, слід використовувати відповідний препарат у вигляді проліків, який перетворює в його активну форму в організмі пацієнта. Запобіжні заходи, які можуть бути прийняті при застосуванні проліків та ліків, описано у літературі, див. обор у Ozama, J. Toxicol. Sci. 21 (1996), 323-329. У кращому втіленні способу по дійсному винаході зазначений винахід або проліки являє собою похідні ліків, як зазначено вище.

Ще в одному втіленні дійсний винахід відноситься до інгібітору, який ідентифіковано або отримано способом описаним вище. Переважно цей інгібітор специфічно зв'язується з варіантом білку NBS1 за винаходом. Антитіла, молекули нуклеїнових кислот і інгібітори за динам винаходом переважно мають специфічність, в меншій мірі власне кажучи ідентичної специфічності зв'язування природного ліганду або партнера зв'язування білку NBS1 за винаходом. Антитіло або інгібітор може володіти зв'язувальною спорідненістю до білку NBS1 в меншій мірі 10^5M^{-1} , переважно вище за 10^7M^{-1} і найбільш переважно аж до 10^{10}M^{-1} у випадку, коли активність NBS1 повинна бути подальша. Отже, в переважному втіленні суп ресорне антитіло або інгібітор за винаходом має спорідненість і меншій мірі приблизно 10^{-7}M , бажано в меншій мірі приблизно 10^{-9}M і найбільш бажано - приблизно 10^{-11}M .

Крім того, даний винахід відноситься до застосування оліго- або полінуклеотиду для виявлення полінуклеотиду за винаходом і/або для генетипування відповідних індивідуальних алелей NBS1. Бажано вказаний оліго- або полінуклеотид являє собою полінуклеотид або молекулу нуклеїнової кислоти за винаходом, що описано вище.

У конкретному переважному втіленні довжина вказаного олігонуклеотиду складає приблизно від 10 до 100, більш бажано від 15 до 90 нуклеотидів, він містить нуклеотидну послідовність, яка входить в одну з SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5-12 або послідовність, яка комплементарна будь який з них.

Отже, ще в одному з наступних втілень даний винахід відноситься до праймеру або зонду, який складається з олігонуклеотидів, як було визначено вище. У даному контексті термін "який складається з" означає, що нуклеотидна послідовність, що описана вище і яка використовується для праймерів або зондів за винаходом, не має яких-небудь додаткових нуклеотидних послідовностей гену NBS1, які безпосередньо належать до її 5' або 3' кінців. Проте інші угруповання, такі як мітки, наприклад, молекули біотину, гістидинові "прапорці", фрагменти антитіла, колоїдне золото і т.і., а також нуклеотидні послідовності, які не відповідають гену NBS1, можуть бути присутніми, за винаходом, у праймері і зондах. Крім того, також можливо використовувати конкретні вищеописані нуклеотидні послідовності і комбінувати їх з іншими нуклеотидними послідовностями, які отримано з гену NBS1, де ці додаткові нуклеотидні послідовності розподілені між угрупованнями, що відрізняються від нуклеїнових кислот, або де нуклеїнові кислоти не відповідають нуклеотидним послідовностям гену NBS1. Крім того, даний винахід відноситься до застосування антитіла або речовини, яка здатна до специфічного зв'язування з генним продуктом гену NBS1, для виявлення варіанту білку NBS1 за винаходом, експресії молекулярного варіанту гена NBS1, який містить полінуклеотид за винаходом.

Також, даний винахід відноситься до композиції, переважно фармацевтичної композиції, що містить антитіло, молекулу нуклеїнової кислоти, вектор або інгібітор за даним винаходом й, можливо, фармацевтично прийнятний носій. Ці фармацевтичні композиції, що містять, наприклад, інгібітор або його фармацевтично прийнятні солі, можна зручно вводити кожним зі шляхів, загальноприйнято використовуваних для введення ліків, наприклад, перорально, місцево, парентерально або шляхом інгаляції. Прийнятні солі включають ацетат, метиловий ефір, гідрохлорид, сульфат, хлорид тощо. Сполуки можна вводити в традиційних лікарських формах, виготовлених шляхом об'єднання ліків зі стандартними фармацевтичними носіями відповідно до традиційних методик. Ці методики можуть включати змішування, гранулювання й пресування або розчинення інгредієнтів, як придатно, з одержанням бажаного препарату. Повинно бути зрозуміло, що форма й характер фармацевтично прийнятного носія або розріджувача продиктовані кількістю активного інгредієнта, з яким його поєднують, а також із введенням й інших добре відомих змінних. Носій(і) повинен(ні) бути «прийнятним»(и) у значенні сумісності з іншими інгредієнтами препарату й нешкідливості для реципієнта. Фармацевтичний носій, що застосується, може бути, наприклад, твердим або рідким. Прикладами твердих носіїв є лактоза, магнезія, сахароза, тальк, желатин, агар, пектин,

аравійська камедь, стеарат магнію, стеаринова кислота й т.п. Прикладами рідких носіїв є забуферений фосфатом фізіологічний розчин, сироп, масло, таке як арахісове масло й оливкове масло, вода, емульсії, різні типи зволожуючих агентів, стерильні розчини тощо. Подібним чином, носій або розріджувач може включати матеріал, що сповільнює вивільнення, добре відомий у даній області, наприклад глицерилмоностеарат або глицерилдистеарат, один або в комбінації з воском.

Режим дозування ліків будуть визначатися лікарем й іншими клінічними факторами; переважно, відповідно до кожного з вищеописаних способів. Як добре відомо в медицині, дозування для будь-якого пацієнта залежать від багатьох факторів, включаючи розмір пацієнта, площу поверхні тіла, вік, конкретну сполуку, яку потрібно вводити, стать, час і шлях введення, загальний стан здоров'я й інші ліки, які вводять одночасно. Моніторинг прогресу проводять шляхом періодичного обстеження.

Крім того, застосування фармацевтичних композицій, що містять антизмистові олігонуклеотиди, що специфічно гібридизуються із РНК, які кодуються варіантами мутованого гена NBS1 за винаходом, що містять антитіла, що специфічно розпізнають білок NBS1, який мутується але не розпізнають, або власне кажучи не розпізнають функціональну форму дикого типу, можливо у випадках, у яких концентрація мутованої форми в клітинах повинна бути знижена.

Крім того, даний винахід відноситься до діагностичної композиції або до набору, що містить кожну з вищезгаданих полінуклеотидів, векторів, клітин-хазяїв, варіантів білків NBS1, антитіл, інгібіторів, молекул нуклеїнових кислот або відповідних векторів за винаходом й, можливо, підходящі засоби для виявлення.

Набір за винаходом може містити додаткові інгредієнти, такі як селективні маркери й компоненти для селективних середовищ, придатні для одержання трансгенних клітин і тварин. Набір за винаходом переважно можна використати для здійснення способу за винаходом, а також можна, серед іншого, використати його для різного застосування, наприклад, в області діагностики або як дослідницький інструмент. Частина набору за винаходом можуть бути упаковані індивідуально у флаконах або в комбінації в контейнерах або пристроях з множини контейнерів. Виробництво цього набору переважно здійснюють за стандартними методиками, які відомі фахівцям у даній області. Набір або діагностичні композиції можна використати в способах виявлення експресії мутантної форми гена NBS1 й у кожному з вищеописаних способів за винаходом, застосовуючи, наприклад, методики імунологічного аналізу, такі як радіоімуннологічний аналіз або ферментативний імунологічний аналіз, або, переважно, гібридизацію нуклеїнових кислот й/або методики ампліфікації, такі як описані вище й у прикладах, або методики на основі мікрочипів.

Деякі генетичні зміни приводять до зміненого конформаційного стану білка. Відновлення нормальної або регульованої конформації мутованих

білків являє собою найбільш витончений і специфічний шлях виправлення цих молекулярних дефектів, хоча він і важкий. Фармакологічні маніпуляції, таким чином, можуть мати на меті відновлення конформації білка дикого типу. Таким чином, полінуклеотиди й білки, що кодуються за даним винаходом можна також використати для дизайну й/або ідентифікації молекул, які здатні активувати функцію гена або білка NBS1 дикого типу.

В іншому втіленні даний винахід відноситься до застосування ліків або проліків для виготовлення фармацевтичної композиції для лікування або попередження розладу, способом, що діагностується, що описаний вище.

Крім того, даний винахід відноситься до застосування ефективної дози послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує функціональний й експресований білок NBS1 дикого типу, для готування фармацевтичної композиції для лікування, попередження й/або вповільнення розладу, способом, що діагностується за винаходом. Ген, що кодує функціональний й експресований білок NBS1, можна вводити в клітини, які, у свою чергу, продукують необхідний білок. Генотерапія, що заснована на введенні терапевтичних генів у клітини за допомогою ex-vivo або in-vivo методик, є одним з найбільш важливих застосувань переносу генів. Вектори й способи, придатні для in-vitro або in-vivo генотерапії, описані в літературі й відомі фахівцям у даній області; див., наприклад, Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813; Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957 або Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996) 3 635-640, а також джерела, що приводять у даному документі. Ген може бути призначений для прямого введення або введення за допомогою ліпосом або вірусних векторів (наприклад, аденовірусних, ретровірусних) у клітину. Переважно, зазначена клітина являє собою зародкову клітину, ембріональну клітину або яйцеклітину або її похідну, найбільш переважно зазначена клітина являє собою стовбурну клітину.

Як зрозуміло з вищеописаного, переважно, щоб при застосуванні відповідно до винаходу послідовність нуклеїнової кислоти була функціональним чином зчеплена з регуляторними елементами, що дають можливість експресії й/або напрямку білка NBS1 до конкретних клітин. Придатні системи доставки генів, які можна використати відповідно до винаходу, можуть включати ліпосоми, рецептор-опосередковані системи доставки, голу ДНК і вірусні вектори, такі як, серед іншого, віруси герпеса, ретровіруси, аденовіруси й аденоасоційовані віруси. Для гемотерапії доставку нуклеїнових кислот у конкретний сайт в організмі можна також здійснювати з використанням біолістичної системи доставки, такої як описана Williams (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), 2726-2729). Стандартні способи трансфекції клітин рекомбінантними ДНК добре відомі фахівцям в області молекулярної біології, наприклад, вони описані в WO 94/29469,

див. також вище. Генотерапію можна здійснювати шляхом безпосереднього введення молекули рекомбінантної ДНК або вектора за винаходом пацієнтові або шляхом трансфекції клітин полінуклеотидом або вектором за винаходом *ex vivo* й інфузії цих трансфікованих клітин пацієнтові.

У кращому втіленні застосування й способів відповідно за винаходом розлад являє собою рак, як згадано вище.

Інші шляхи застосування поліморфізмів, описаних у зв'язку з даним винаходом, а також засобів і способів, які можна використати відповідно до вищеописаних втілень, можна знайти в рівні техніки, наприклад, вони розкриті в US-A-5856104, де засоби й способи, застосовувані в судовій медицині, для тестування батьківства, кореляції поліморфізмів з фенотипічними ознаками, генетичного картування фенотипічних ознак і т.д. можна рівною мірою втілювати відповідно до даного винаходу.

Крім того, у даному винаході запропонований спосіб виявлення схильності до раку простати у суб'єкта, що включає виявлення в біологічному зразку від суб'єкта зміни в послідовності гена NBS1, де це зміна є показником схильності до раку простати. Суб'єкт може являти собою людину, наприклад, слов'янського походження.

Крім того, у даному винаході запропонований спосіб виявлення схильності до раку молочної залози у суб'єкта, що включає виявлення в біологічному зразку від суб'єкта зміни в послідовності гена NBS1, де ця зміна є показником схильності до раку молочної залози. У деяких втіленнях винаходу рак молочної залози долькового підтипу. Суб'єкт може являти собою людину, наприклад, слов'янського походження.

У деяких втіленнях винаходу зміна являє собою спадкову зміну, наприклад, 657de15. Ця зміна може бути присутньою у послідовності одного алеля гену NBS1, або ця зміна може бути присутньою у послідовності двох алелів гена NBS1. Зміна може являти собою мутацію в гені NBS1, наприклад, мутацію, викликану інсерцією у гені, делецією гену або заміною нуклеотида(ів) у гені. У деяких втіленнях зміна в гені впливає, на продукування білку, геном NBS1, що кодується, наприклад, інгібує його. Результатом цієї зміни може бути продукування білку, що відрізняється, наприклад укороченого, в порівнянні з білком, що повинен продукуватися геном NBS1. Такий білок може не мати функціональні властивості, якими володіє білок, що кодується геном NBS1.

У деяких втіленнях зміна може бути виявлена за допомогою ПЦР із алель-специфічними олігонуклеотидами (ASO, allele-specific oligonucleotide), аналізи на виявлення поліморфізму однострочної конформації (SSCP, single-stranded conformation polymorphism), прямого секвенування, мікрочипів, прямого секвенування, алель-специфічної ампліфікації (ASA, allele-specific amplification) або RFLP-ПЦР. Схильність може являти собою успадковану схильність. У деяких втіленнях біологічний зразок може являти собою зразок тканини, такий як кров, і біологічний зразок може включати лейкоцити. У деяких втіленнях винаходу рак молочної залози

являє собою інвазивний рак молочної залози долькового підтипу.

Далі, даним винаходом запропонований діагностичний набір для ідентифікації схильності до раку молочної залози або до раку простати у суб'єкта, що включає пакувальний матеріал і щонайменше два різних полінуклеотида, здатних ампліфікувати щонайменше район гена NBS1. У деяких втіленнях винаходу ампліфікований район включає мутацію 657de15. У деяких втіленнях винаходу набір може містити полінуклеотиди Nbsex6f, Nbsex6r й Nbsde15. Набір може також містити інструкції, наприклад, інструкції з використання набору для ідентифікації схильності до раку молочної залози або до раку простати у суб'єкта.

Способи й набори, запропоновані тут, корисні для виявлення схильності до раків, таких як рак простати й дольковий інвазивний рак молочної залози, і вони можуть бути також корисні для діагностики раків, таких як раки простати й молочної залози на самих ранніх клінічних стадіях.

Зміна в гені NBS1, наприклад, зміна 657de15, може бути виявлена за допомогою будь-якого аналізу, доступного фахівцеві в даній області, що здатний здійснити виявлення зміни, наприклад, за допомогою аналізу елонгації нуклеотидів, аналізів послідовності, гібридизаційних аналізів й/або ампліфікаційних аналізів. Зміну можна виявити шляхом проведення аналізів на будь-якій формі ДНК або РНК, отриманої від суб'єкта. Наприклад, фахівець у даній області може ідентифікувати зміну, використовуючи ПЦР із алель-специфічними олігонуклеотидами, аналізи на виявлення поліморфізму однострочної конформації (SSCP, single-stranded conformation polymorphism), прямого секвенування, алель-специфічної ампліфікації, алель-специфічної гібридизації й/або поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів після ПЦР ампліфікації (RFLP-ПЦР). Гібридизацію можна проводити в різних умовах, підібраних фахівцем у даній області. Деякі приклади описані тут нижче.

«Жорсткі умови гібридизації» й «жорсткі умови гібридизаційного відмивання» у контексті експериментів по гібридизації полінуклеотида, таких як Саузерн- і Норзерн-блот-гібридизації, залежать від послідовності й розрізняються різними параметрами навколишнього середовища. Більш довгі послідовності специфічно гібридизуються при більш високих температурах. «T_m» означає температуру (при певній іонній силі й рН), при якій 50% послідовності-мішені гібридизуються з високо відповідним зондом. Специфічність типово є функцією відмивання після гібридизації, причому критичними факторами є іонна сила й температура кінцевого розчину, що відмився. Для ДНК-ДНК гібридів T_m можна апроксимувати на підставі рівняння Meinkoth й Wahl, Anal. Biochem., 138: 267 (1984); T_m 81,5 C+16,6 (log M)+0,41 (%GC) 0,61 (% form) 500/L; де M - молярність одновалентних катіонів, %GC - відсоток нуклеотидів гуанозину й цитозину в ДНК, %form - відсоток формаміда в гібридизаційному розчині й L - довжина гібрида в парах основ. T_m знижують приблизно на 1°C на кожен 1% неспарювання; таким чином, T_m, умови гібридизації й/або відмивання можна відрегулювати

для гібридизації послідовностей бажаної ідентичності. Наприклад, якщо припускають послідовності з ідентичністю >90%, T_m може бути знижена на 10°C. Як правило, жорсткі умови вибирають такими, щоб температура була приблизно на 5°C нижче точки плавлення (T_m) для конкретної послідовності і її комплементу при певній іонній силі й рН. Однак при дуже жорстких умовах можна проводити гібридизацію й/або відмивання при температурі на 1, 2, 3 або 4°C нижче точки плавлення (T_m); при помірковано жорстких умовах можна проводити гібридизацію й/або відмивання при температурі на 6, 7, 8, 9 або 10°C нижче точки плавлення (T_m); при умовах слабкої жорсткості можна здійснювати гібридизацію й/або відмивання при температурі на 11, 12, 13, 14, 15 або 20°C нижче точки плавлення (T_m). При використанні вищенаведеного рівняння, сполук для гібридизації й відмивання й бажаної T_m , звичайний фахівець у даній області буде розуміти, що варіації жорсткості гібридизації й/або розчинів, що відмиваються, природно, описані в літературі. Якщо бажаний ступінь неспарювання приводить у результаті до T менш 45°C (водяний розчин) або 32°C (формамідний розчин), переважно збільшити концентрацію SSC так, щоб використати більш високу температуру. Великий посібник з гібридизації полінуклеотидів можна знайти в Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Hybridization with Nucleic Acid Probes*, part I chapter 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of polynucleotide probe assays" Elsevier, New York (1993). Як правило, жорсткі умови вибирають так, щоб температура була приблизно на 5°C нижче точки плавлення (T_m) для даної послідовності при заданій іонній силі й рН.

Прикладом умов відмивання високої жорсткості є 0,15M NaCl при 72°C протягом приблизно 15 хвилин. Прикладом жорстких умов відмивання є відмивання 0,2X SSC при 65°C протягом 15 хвилин (див. опис буфера SSC в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Sambrook et al., 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001)). Часто відмиванню високої жорсткості передують відмивання низької жорсткості для видалення фонових сигналів зонда. Прикладом відмивання середньої жорсткості для дуплекса, наприклад, більш ніж 100 нуклеотидів є 1X SSC при 45°C протягом 15 хвилин. Прикладом відмивання слабкої жорсткості для дуплекса, наприклад, більш ніж 100 нуклеотидів є 4-6X SSC при 40°C протягом 15 хвилин. Для коротких зондів (наприклад, від приблизно 10 до 50 нуклеотидів) жорсткі умови типово включають концентрації солі менш, ніж приблизно 1,5M, більш переважно від приблизно 0,01 до 1,0M, концентрація іона натрію (або інших солей) при рН від 7,0 до 8,3, а температура типово становить щонайменше 30°C і щонайменше приблизно 60°C для довгих зондів (наприклад, >50 нуклеотидів). Жорсткі умови можуть бути також досягнуті додаванням дестабілізуючих агентів, таких як формамід. Як правило, відношення сигналу до шумового фону 2X (або вище) сигнали, що спостерігається для невідповідного зонда в конкретному гібридизаційному аналізі, показує виявлення специфічної гібридизації. Полінуклеотиди, які не гібридизуються

один з одним у жорстких умовах, все-таки є по суті ідентичними, коли білки, які вони кодуєть, є по суті ідентичними. Це відбувається, наприклад, коли копія полінуклеотида створена з максимальною вироджуваністю кодонів, що допускається генетичним кодом.

Дуже жорсткі умови гібридизації вибирають як рівні T_m для конкретного зонда. Прикладом жорстких умов гібридизації комплементарних нуклеїнових кислот, які має більш ніж 100 комплементарних залишків, на фільтрі в Саузерн- або Норзерн-блотінзі є 50% формамід, наприклад, гібридизацію проводять в 50% формаміді, 1M NaCl, 1% ДСН при 37°C і відмивання проводять в 0,1X SSC при температурі від 60 до 65°C. Приблизні умови слабкої жорсткості включають гібридизацію з буферним розчином від 30 до 35% формаміда, 1M NaCl, 1% ДСН (додецилсульфат натрію) при 37°C і відмивання - в 1X-2X SSC (20X SSC=3,0M NaCl/0,3M тринатрію цитрат) при температурі від 50 до 55°C. Приблизні умови помірної жорсткості включають гібридизацію в 40-45% формаміді, 1,0M NaCl, 1% ДСН при 37°C і відмивання в 0,5X-1X SSC при температурі від 55 до 60°C.

Тут описані деякі полінуклеотиди, які корисні для виявлення змін, і фахівець у даній області зможе сконструювати інші полінуклеотиди, які будуть корисні при виявленні зміни. Таким чином, у даному винаході також запропоновані полінуклеотиди, що містять будь-яку з SEQ ID NO 6-12, що складаються по суті із цих послідовностей або складаються із цих послідовностей.

Пухлини в людини часто пов'язані з геномною нестабільністю, і біохімічний шлях передачі сигналу про ушкодження ДНК відіграє критичну роль у підтримці цілісності геному у відповідь на фактори, що ушкоджують ДНК. Цей біохімічний шлях може відігравати важливу роль у патогенезі раку простати. Передача сигналу про ушкодження ДНК переривається мутаціями, що викликають синдроми розриву хромосом у людини, такі як Ниймегенський синдром (NBS), синдром Блума, анемія Фанкони й атаксія-телеангіектазія (АТ), які характеризуються «спонтанною» хромосомною нестабільністю, імунodefіцитом і схильністю до раку (Digweed, 1993; Futaki et al, 2001). Ген Ниймегенського синдрому NBS1 картирован на хромосомі 8q21 і клонований (див. Varon et al., 1998; Патент США №6458534; і Genbank, реєстраційний номер AB013139). Продукт гена NBS1, нибрин (так званий p95) являє собою інтегральний компонент нуклеазного комплексу hMRE11/hRAD50/NBS1, що є частиною BRCA1-асоційованого комплексу контролю генома (BASC), відповідального за репарацію ушкоджень ДНК (Futaki et al., 2001). Делеція, що укорочує 5 п.о. в екзоні 6 гена NBS1 була виявлена в переважній більшості пацієнтів з NBS. Більшість пацієнтів з NBS, про які повідомляли, - слов'янського походження й мають мутацію-засновник 657de15. Ця мутація присутня з несподівано високою частотою зустрічальності в Польщі, Україні й Чеській Республіці (Varon et al., 2000). Роль гена NBS1 у розвитку раку простати й дольового інвазійного раку молочної залози ще не досліджена.

Як описано в даному документі, виявилось, що NBS1 діє як класичний ген пухлинного супресора, оскільки біалельну інактивацію NBS1 спостерігають при більшості пухлин. Однак не виключений деякий ступінь гапліодної недостатності й можливого домінантно-негативного ефекту мутацій NBS1, оскільки не встановлено, що гетерозиготні по NBS1 клітини мають порушену здатність до репарації ДНК. Було передбачено, що алель-засновник NBS1 приводить у результаті до укороченого білка з 219-754 амінокислот (p26). У p26 відсутній критичний домен, необхідний для взаємодії MRE11. Невідомо, чи володіє цей мутантний білок якою-небудь залишковою активністю або проявляє домінантно-негативний ефект. Однак алель 657de15 також створює аберантний сайт ініціації трансляції, що створює частково функціональний варіант білка NBS1 (p70). Білок p70 містить зв'язуючий MRE11 домен, але не забезпечує повну функцію усередині комплексу MRE11. У світлі цього представляється можливим, що p70 може робити домінантно-негативний ефект.

Крім того, даний винахід відноситься до використання успадкованої зміни в послідовності гена NBS1 для ідентифікації успадкованої схильності до раку простати або інвазивного раку молочної залози дольового підтипу у людини. Переважно зазначена успадкована зміна являє собою мутацію 657de15, а досліджуваний суб'єкт людина являє собою особу слов'янського походження. Наявність цієї успадкованої зміни може бути виявлена щонайменше одним способом, обраним з ASO ПЦР, SSCP, мікрочипів, прямого секвенування, ASA, RFLP ПЦР.

Крім того, даний винахід відноситься до діагностичного набору для ідентифікації успадкованої схильності до раку простати або інвазивного раку молочної залози дольового підтипу способом, заснованим на ПЦР, що включає щонайменше два різних олігонуклеотида, що дають можливість ампліфікації району, що включає успадковану зміну в послідовності гена NBS1, де можливо цей ампліфікований район включає мутацію 657de15. Переважно зазначений набір містить праймери Nbsex6f, Nbsex6r й Nbsde15. Даний винахід також відноситься до протоколу для раннього виявлення раку молочної залози, відмінному від регулярних стандартів на підставі повторюваності успадкованої мутації NBS1.

Ці й інші втілення описані або очевидні з опису й прикладів винаходи й охоплені ними. Додаткову літературу, що стосується кожного зі способів, застосувань і сполук для використання відповідно до даного винаходу, можна знайти в публічних бібліотеках, використовуючи, наприклад, електронні пристрої й бази даних, доступні в Інтернеті.

Фармацевтичні й діагностичні композиції, шляхи застосування, способи по винаходу можна використати для діагностики й лікування всіх видів захворювань, дотепер невідомих, стосовних до варіантів генів NBS1 або залежних від них. Композиції, способи й застосування даного винаходу можна й бажано застосовувати для людей, хоча лікування тварин також охоплено способами й застосуваннями, описаними тут.

На Фіг.1 зображений LOH аналіз отриманих шляхом мікрургії зрізів тканин РС від пробанда сім'ї 8 (доріжки 1-5) і пробанда сім'ї 9 (доріжки 1b-5b) з використанням маркерів, що фланкують ген NBS1 (доріжки 1-3 й 1b-3b) і з використанням екзон-специфічної ПЦР (доріжки 4-5, 4b-5b). Втрача алеля дикого типу в раковій тканині показана стрілками. Точки вказують на алель із мутацією-засновником NBS1.

На Фіг.2 зображене потомство сімей з мутацією NBS1. Сегрегація мутації NBS1 з раком простати показана в сім'ях 8, 9, 11, 12. Вік індивідуума показаний із правої сторони кожного випадку рака. Точка (·) в нижньому правому куті показує, що аналізували зразок крові. Плюс (+) в верхньому правому куті символу вказує на наявність мутації-засновника NBS1, а мінус (-) вказує на родичів, негативних по цій мутації. Стрілками вказані пробанди. Повністю чорні символи означають пацієнтів з раком, патологічні результати яких доступні; на % чорні символи вказують на пацієнтів з раком, для яких гістопатологія була недоступна. Тип раку вказаний під кожним символом. Додаткова сім'я А, що діагностується в Центрі Ракової Спадкоємності в Щецині, не належить до групи успадкованих випадків РС.

На Фіг.3 зображений фрагмент геномної послідовності гена NBS1, що включає екзон 6. Послідовність екзону 6 показана жирним шрифтом, а мутація 657de15 показана курсивом (див. також Genbank, реєстраційний номер AB013139; Matsura et al., 1998). Далі винахід буде описаний біологічними прикладами, які є винятково ілюстрованими й не призначеними для обмеження об'єму даного винаходу.

Приклад 1. Установлення кореляції між успадкованою зміною в послідовності гена NBS1 і успадкованою схильністю до раку простати або раку молочної залози на прикладі аналізу мутації-засновника 657de15 у гені NBS1.

Зв'язок між 657de15 і раком простати

Пацієнти

Пацієнтів, підозрілих на рак простати, госпіталізують у Клініку Урології в Щецині. Критеріями підозри на рак простати є: підвищений рівень PSA - вище 4,0нг/мл або виявлення аномалій у дослідженні лежачи. Рак простати діагностують у клініці на підставі біопсії DRECUТ при УЗД-контролі, проведеному в підозрілих випадках. Тканини біопсії, пофарбовані з використанням стандартних методик, оцінювали патологи на Кафедрі Генетики й Патології в Щецині. Остаточний діагноз був підтверджений одним патологом - професором Яном Лубінським (Jan Lubinski).

Всі 359 чоловіків, у яких діагностований рак простати в Університетській лікарні в Щецині, Польща, між 1999 й 2002, були запрошені для участі в даному дослідженні. З них 340 (95%) дали згоду на участь. Всіх пацієнтів рекрутували для участі в дослідженні протягом шести місяців від дати діагнозу. Сімейні історії випадків рака одержували від кожного суб'єкта.

Тридцять п'ять пацієнтів (10,3%) мали одного або більше родичів першого або другого ступеня споріднення з раком простати (сімейні випадки).

Автори винаходу також включили другу групу з 21 сімейного випадку раку простати від чоловіків, які були відправлені на дослідження в Центр Ракової Спадковості сімейними лікарями або урологами у зв'язку з об'єднанням сімейних випадків раків простати. Усього було 56 сімейних випадків й 305 несімейних випадків. Випадково відібрані сімейні випадки містили в середньому 2,1 випадок раку простати (середній вік виникнення 67,3 роки) і сімейні випадки, відібрані Спадкоємним Раковим Центром, містили 2,6 випадків раку простати (середній вік виникнення 63,3 роки). Число неуражених контролів становило 1500. Одна тисяча контролів була відібрана випадковим образом з комп'ютерного списку пацієнтів трьох сімейних практик у Щецині (508 жінок й 492 чоловіка; віковий інтервал від 26 до 89 років). Додатково включили другу контрольну групу з 500 не відібраних немовлят із Щецина, для яких були доступні зразки крові з пупочної нитки. На Фіг.2 зображене потомство сімей з мутацією NBS1.

Зв'язок між 657de15 і раком молочної залози дольового підтипу

Пацієнти

Досліджувана група включала 2012 жінок з раком молочної залози, відібраних без урахування природи раку. Випадки раку молочної залози рекрутували з 8 лікарень із усією Польщі (таблиця 1). Пацієнти кілька разів підтверджувалися патологічними відділеннями лікувальних установ. Включали тільки первинний інвазивний рак молочної залози (випадки DCIS й LCIS виключали). Пацієнтів збирали в період з 2002 по 2003р.р.. Дві тисячі контролів із загальної популяції використали для дослідження зв'язку між алелем-засновником NBS1 (1000 не відібраних дорослих із Щецина й 1000 немовлят дітей в 2003 р. із шести лікарень із усією Польщі (Щецин, Белосток, Горзов, Катовице й Вроцлав). Метою контрольної групи була оцінка частоти NBS1 657de15 у загальній популяції.

Таблиця 1

Частота мутантного алеля-засновника MBS1 серед пацієнтів з раком молочної залози у восьми районах Польщі

Місто	Число суб'єктів	NBS1 657de15
Щецин	511	5
Бельско-Бяла	172	2
Ополе	480	5
Познань	258	1
Краків	251	2
Кошалин	ПО	1
Люблін	179	1
Бидгощ	51	0
Усього	2012	17

Приклад 2. Виявлення мутації 657de15 у гені NBS1

Автори винаходу використали ASO-ПЦР і секвенування для виявлення мутації-засновника NBS1 у ДНК, виділеної з лейкоцитів периферичної крові.

Одержували 5мл периферичної крові й змішували з 100мкл 1М ЕДТА, потім центрифугували в 50мл поліпропіленових пробірках протягом 10 хвилин при 3000g при 4°C. Сироватку у верхній фазі видаляли, і осад, що містить клітини, змішували з 45мл буфера 2X (0,1М NH₄Cl, 0,25М KHSO₃, 1мМ ЕДТА) і залишали на 15 хвилин при 4°C. Потім суміш центрифугували при 3000g протягом 10 хвилин при 4°C. Супернатант видаляли після центрифугування. Осад, що залишився, з лейкоцитами суспендували в 2X буфері й центрифугували протягом 10 хвилин при 3000g при 4°C. Це очищення лейкоцитів в 2X буфері й центрифугування повторювали три рази до одержання чистого осаду лейкоцитів. Ці лейкоцити змішували з 3мл буфера для перевару (50мМ NaCl, 25мМ MgCl₂, 1мМ ЕДТА; pH8,0) з 200 мкл 10% ДСН й 500мкг протеїнази К. Перевар проводили протягом 24год. при 37°C.

ДНК очищали, використовуючи фенол/хлороформ. Коротко, продукти перевару змішували з 3мл фенола, забуференого 0,5М Трис HCl (pH8,4), а потім з 3мл суміші хлороформу й ізоамілового спирту (у співвідношенні 1:25 об/об). Суміш струшували протягом приблизно 1 хвилини й центрифугували протягом 10 хвилин при 8000g при 20°C. Після центрифугування верхню фазу переносили в нову пробірку й змішували з рівним об'ємом хлороформу, а потім центрифугували протягом 10 хвилин при 8000g. Вищеописане очищення хлороформом повторювали 3 рази до зникнення білкового кільця в інтерфазі.

Очищену водну фазу, що містить ДНК, змішували з 5М NaCl у співвідношенні 10:1 (об/об) і 96% етанолом відносно водної фази з NaCl до етанолу 1:10 (об/об). Суміш залишали на ніч при 20°C. Отриманий у результаті осад ДНК поміщали в нову пробірку й очищали 70% етанолом, центрифугували при 3000g протягом 5 хвилин, і етанол зливали. Потім очищений осад ДНК сушили у відкритій пробірці протягом 30 хвилин при 37°C. ДНК, ресуспендовану в 400 мкл ТЕ буфера (25мМ Трис HCl, 1мМ ЕДТА; pH8,4), зберігали при 4°C до використання.

Алель-специфічна ПЦР (ASO-ПЦР)

Реакцію ASO-ПЦР проводили в апараті DNA ThermalCycler 9600 (Perkin Elmer) в об'ємі 25мкл, що включає: 1мкл (50нг) геномної ДНК, 4пмоль праймера Nbsex6f, 6 пмоль праймера Nbsex6r, 10пмоль праймера Nbsde15, 2,5мкл ПЦР буфера (100мМ Трис-HCl, 500мМ KCl, 15мМ MgCl₂, 1мг/мл желатину; pH8,6), 200мкМ кожного dATP, dCTP, dGTP й dTTP й 1од. Taq ДНК полімерази. У кожній реакції використали 2 позитивних контролі (контролі із ДНК від гетерозиготи NBS1 і гомозиготи NBS1) і 2 негативних контролі (контрольна ДНК від пацієнта, негативного по мутації NBS1, і контроль без ДНК).

Умови ASO-ПЦР:

- Вихідна денатурація - 95°C, 5 хвилин
- 11 циклів, кожний з:
 - денатурації - 94°C 30сек.
 - отжигу праймерів - від 62 до 56°C 30сек*
 - елонгації праймерів - 72°C 30сек.
- 30 циклів, кожний з:

денатурації - 94°C 30сек.

отжигу праймерів - 56°C 30сек.

елонгації праймерів - 72°C 30сек.

* - протягом перших 11 циклів температуру отжигу праймерів знижували на 0,6°C у кожному циклі, починаючи з 62°C у першому циклі й закінчуючи 56°C в 11-м циклі (докладно: 1-й цикл - 62°C, 2-й цикл - 61,4°C, 3-й цикл - 60,8°C, 4-й цикл - 60,2°C, 5-й цикл - 59,6°C, 6-й цикл - 59°C, 7-й цикл - 58,4°C, 8-й цикл - 57,8°C, 9-й цикл - 57,2°C, 10-й цикл - 56,6°C, 11-й цикл - 56°C).

Послідовність праймерів, використаних в ASO-ПЦР:

Nbsex6f, 5' CACCTCTTGATGAACCATCT (SEQ ID NO:6)

Nbsex6r, 5' CGTTAACAACCTACTGATAAGAG (SEQ ID NO:7)

Nbsde15, 5' GGACGGCAGGAAAGAAATCTT (специфічний праймер для 657de15) (SEQ ID NO:8)

5мкл продуктів ПЦР змішували з 10мкл буфера завантаження й піддавали електрофорезу в агарозному гелі (1,5% агарозний гель (SeaKem FMC), 1X буфер TBE, 25пг/мол бромистого етидія) при 6В/см протягом 30 хвилин. Розділені продукти візуалізовані в Уф-світлі. Всі випадки, у яких спостерігали додатковий більш короткий продукт ПЦР, секвенували з метою підтвердження наявності мутації-засновника NBS1.

Секвенування

Матрична ПЦР

Екзон 6 гена NBS1 ампліфіцировали із праймерами Nbsex6f й Nbsex6r у таких умовах, як описано для ASO-PCR, з тією єдиною відмінністю, що в матричній ПЦР праймер Nbsde5 не використовували.

Очищення продуктів ПЦР

Продукти ампліфікації екзона 6 переносили піпеткою в резервуар для зразків Microcon-100 (Amicon), поміщений у флакон, і додавали в резервуар 400мкл dH₂O і центрифугували при 1850g протягом 15 хвилин. Після центрифугування резервуар для зразків поміщали в новий флакон, наповнений 400мкл dH₂O, і центрифугували при 1850g протягом 15 хвилин. Останню стадію повторювали 3 рази. Резервуар для зразків поміщали нагором у новий флакон, а потім центрифугували протягом 3 хвилин при 9000g. Усі центрифугування проводили при 25°C. У флаконі було видно приблизно 5мкл очищеного продукту ПЦР, і його розводили в 20мкл dH₂O.

ПЦР, що секвенує

Асиметричну ПЦР, що секвенує, проводили в термоциклері Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer) в об'ємі 20мкл, що містить: 1 пмоль праймера Nbsex16f, 4мкл очищені продукти ПЦР, 8мкл BigDye Terminator Ready Reaction Kit v3.0 (Applied Biosystems). Крім того, реакцію, що секвенує із праймером Nbsde16r, проводили для підтвердження результатів із прямим праймером.

Умови секвенування:

Вихідна денатурація - 96°C 30сек.

30 циклів, кожний з:

денатурації - 94°C 30сек.

отжигу праймерів - 56°C 30сек.

елонгації праймерів - 72°C 30сек.

20мкл продукту секвенування поміщали в 0,5мл пробірку Еппендорф, додавали 60мкл 96% етанолу й 2мкл 3М цитрату натрію (pH4,6). Проби центрифугували протягом 20 хвилин при 3000g при 25°C. Потім супернатант видаляли й додавали 200мкл 70% етанолу для очищення осаду. Після 5 хвилин центрифугування при 3000g при 25°C супернатант видаляли. Осад висушували в Eppendorf Concentrator 5301 протягом 20-30хв., а потім ресуспендували в 4мкл буфера нанесення (150мкл деіонізованого формаміда, 50мкл 50мМ EDTA, 0,05% Dextran Blue). Зразки денатурували протягом 4 хвилин при 94°C, поміщали на лід і наносили на денатурований поліакриламідний гель (4% 19:1 поліакриламідний гель, 1X TBE, 6М сечовина). Електрофорез проводили в ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Збір й аналіз даних здійснювали, використовуючи програмне забезпечення ABI PRISM 377 Collection Software й Sequencing Analysis Software Version 3.0 (Applied Biosystems).

Приклад 3. Аналіз втрати гетерозиготності (LOH) при раку простати й молочної залози

Мікровисічення й виділення ДНК

Щоб проаналізувати, чи загублений алель NBS1 дикого типу при раку простати й раку молочної залози, автори винаходу провели LOH-аналіз у пухлинах після мікровисічення носіїв мутації NBS1 - в 9 випадках раку простати й 5 випадках рака молочної залози. LOH проводили, використовуючи маркери, що фланкують ген NBS1 - D8S88, D8S1811 і мічені флуоресцентною міткою праймери, специфічні до екзону 6 NBS1 (9).

Готували зрізи з п'яти мікронів, фіксованих у формаліні й ув'язнених у парафін тканин і розміщали їх на скельцях. Для кожного пацієнта тканини різали для 6 скельців. Одне скло фарбували гематоксиліном/еозиноом. Інші скельця використовували для мікровисічення. Зрізи звільняли від парафіну у двох змінах ксилолу протягом 5 хвилин. Зрізи гідратували з використанням серії градуированих спиртів (в 96% етанолі (2 рази), 70% етанол й dH₂O, у кожному по 5 хвилин). Скельця фарбували гематоксиліном. Використовуючи світловий мікроскоп, вибирали однорідні поля ракових кліток у ГЕ-пофарбованих зрізах. Ці поля обережно піддавали мікровисіченню, використовуючи голку, зі скельців, пофарбованих тільки гематоксиліном, під світловим мікроскопом, уникаючи забруднення доброякісними клітинами. Зрізи, отримані шляхом мікровисічення, поміщали в пробірки Еппендорф на 1,5мл. Паралельно нормальні тканини вирізали з тих же скельців і поміщали в інші окремі пробірки.

Потім тканини, піддані мікровисіченню, поміщали в 1мл буфери для ферментативного гідролізу (50мМ Трис-HCl, 1мМ CaCl₂, pH8,0) з 20мкл 10% ДСН й 500мкг протеїнази К. У кожній серії використовували негативні контролю без тканини. Ферментативний гідроліз проводили при 55°C протягом 2 тижнів. На 3-ю й 6-у добу гідролізу додавали додатково 100мкг протеїнази К. Після гідролізу протеїназу інактивували нагріванням при 96°C протягом 10 хвилин. 500мкл продукту фермента-

тивного гідролізу очищали в пробірках Microcon-100 (Amicon) відповідно до вищеприписаної методики. Після очищення приблизно 5мкл розчину, що містить ДНК, розводили в 50мкл dH₂O.

LOH-аналіз

LOH-аналіз проводили в 3 реакціях ПЦР із флуоресцентними праймерами:

1) ПЦР1 із праймерами D8S88f - 5' TCCAGCAGAGAAAGGGTTAT (SEQ ID NO:9); D8S88r - 5' GGCAAAGAGAACTCATCAGA (SEQ ID NO:10),

2) ПЦР2 із праймерами D8S1811f - 5' CCCACCCCCAAAATGC (SEQ ID NO:11); D8S1811r - 5' GGGTTTAGGGAAGTGCAGAA (SEQ ID NO:12),

3) ПЦР3 із праймерами Nbsex6f й Nbsex6r, що фланкують екзон 6 NBS1, що містить 657de15. Реакцію ПЦР проводили в DNA ThermalCycler 9600 (Perkin Elmer) в об'ємі 25мкл, що включав: 4мкл ДНК, виділеної із тканин, 2,5мкл ПЦР буфера (100мМ Трис-НСІ, 500мМ КСІ, 15мМ MgCl₂, 1мг/мл желатини; рН8,6), 200пМ кожного dATP, dCTP, dGTP й dTTP, 1од. Taq ДНК полімерази й 10мкг бичачого сироваткового альбуміну (BCA - Fermentas). Суміш ПЦР1 включала додатково 5пмоль праймерів D8S88f й D8S88r, ПЦР2 - 5пмоль праймерів D8S1811f й D8S1811r, ПЦР3 - 5пмоль праймерів Nbsex6f й Nbsex6r. У кожній реакції ПЦР використовували позитивні й негативні контролю.

Умови ПЦР:

в) Вихідна денатурація - 95°C 5 хвилин

г) 42 циклу, кожний з:

денатурації - 94°C 30сек.

отжигу праймерів - 56°C 30сек.

елонгації праймерів - 72°C 30сек.

Один мкл продукту ПЦР розводили в 10мкл буфера нанесення (150мкл формаміда, 50мкл 50мМ ЕДТА, 0,05% Dextran Blue). Після денатурації протягом 4 хвилин при 94°C зразки поміщали в лід і наносили на поліакриламідний гель, що денатурує (4% 19:1 поліакриламідний гель, 1X TBE, 6М сечовина). Електрофорез проводили в ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). Збір й аналіз даних здійснювали, використовуючи про-

грамне забезпечення ABI PRISM 377 Collection Software й GenScan Analysis Software Version 3.0 (Applied Biosystems). Зниження сигналу в одному алелі щонайменше на 70% приймали за поріг розпізнавання для LOH.

Статистичний аналіз проводили, використовуючи критерій Хі-квадрат.

Мутація NBS1 була присутня в дев'ятьох з 340 випадково відібраних випадків раку простати (2,6%) у порівнянні тільки з дев'ятьма з 1500 (0,6%) контрольних індивідумів із загальної популяції (відношення odds 4,5; 95% CI 1,7 до 11,5; p=0,002). Успадкована мутація 657de15 була присутня в п'ятьох з 56 (9%) сімейних випадків (відношення odds =16; 95% CI=5,2 до 50; p<0,0001). Автори винаходу досліджували сегрегацію мутантного алеля NBS1 з раком простати в чотирьох сім'ях. Авторам винаходу вдалося встановити стан мутації у двох уражених чоловіків з кожної сім'ї. У кожній сім'ї мутація NBS1 була присутня в обох уражених її членів.

Алель 657de15 був виявлений в 17 (0,8%) з 2012 простежених раків молочної залози в порівнянні з 8 в 2000 контролях (відношення odds 1,9; 95% CI=0,8 до 4,2, p=0,17). Укладені в парафін тканини одержали з 12 випадків раку молочної залози від носіїв мутації NBS1. Тип цих пухлин визначали два патологи після фарбування гематоксиліном/еозином (Г/Е) і імуногістохімічного фарбування. Дев'ять із 12 випадків раку молочної залози являли собою крупноклітинні інфільтруючі долькові карциноми (див. таблицю 2). Зрізи Г/Е були доступні від 491 з 2012 досліджених випадків. Всі ці випадки були з одного центра: районної онкологічної лікарні в Щецині. Двома патологами був установлений тип раку молочної залози у всіх 491 випадках. Долькові карциноми були діагностовані в 53 з 491 досліджених раків молочної залози. Із цих 53 пацієнтки з раком молочної залози мутації NBS1 минулого виявлені в 4 (7,5%) випадків (OR 18,4, 95% CI 5,5 - 62, p<0,0001). Таким чином, мутація NBS1 пов'язана із крупноклітинною інфільтруючою дольковою карциномою молочної залози.

Таблиця 2

Гістопатологічні дані носіїв зміни 657de15 серед жінок з раком молочної залози

існт	к (роки)	ший патологічний діагноз	ологічний діагноз після повторної ки стекл
1	44	Інфільтруюча протокова карцинома	Інфільтруюча протокова карцинома
2	56	Інфільтруюча долькова карцинома	Інфільтруюча долькова карцинома
3	38	Інфільтруюча протокова карцинома	Інфільтруюча протокова карцинома
4	42	Інфільтруюча протокова карцинома	Інфільтруюча долькова карцинома
5	47	Інфільтруюча долькова карцинома	Інфільтруюча долькова карцинома
6	47	Інфільтруюча тубулярна карцинома	Інфільтруюча тубулярна карцинома
7	68	Інфільтруюча долькова карцинома	Інфільтруюча долькова карцинома
8	46	Інфільтруюча долькова карцинома	Інфільтруюча долькова карцинома
9	57	Інфільтруюча долькова карцинома	Інфільтруюча долькова карцинома
10	49	Інфільтруюча протокова карцинома	Інфільтруюча долькова карцинома
11	46	Інфільтруюча долькова карцинома	Інфільтруюча долькова карцинома
12	52	Інфільтруюча долькова карцинома	Інфільтруюча долькова карцинома

Втрату алеля NBS1 спостерігали в 7 з 8 випадків раку простати (Фіг.1) і 5 з 5 випадків раку молочної залози. Дані по втраті гетерозиготності дозволяють припустити, що функції NBS1 є класичними функціями гена придушення пухлини. Втрата гетерозиготності в локусі NBS1 також показана при раку яєчника й злоякісній меланомі (8, 10). Клінічно Ніймегенський синдром являє собою рецесивно-генетичний стан. Гетерозиготний стан може бути нешкідливим на клітинному рівні, але втрата гетерозиготності робить клітини гемізиготними по мутантному алелю. Культивовані клітини, гомозиготні по мутації NBS1, схильні до хромосомних аберацій (10).

Алель-засновник NBS1, як виявилось, відповідальний приблизно за одну з 11 сімей із двома або більш, ніж двома випадками раку простати в Польщі. На підставі відносного ризику 4,5 і частоти мутації 1 на 167 автори винаходу оцінюють, що цей ген відповідальний приблизно за 2% раків простати в цій країні. Автори винаходу не спостерігали статистично достовірного перевищення алеля-засновника NBS1 у жінок з раком молочної залози, відібраних без обліку природи рака. Однак 657de15 сполучалася з підвищеним ризиком долькової карциноми молочної залози (OR 18,4, $p < 0,0001$). З огляду на географічний розподіл описаних клінічних випадків Ніймегенського синдрому, мутація 657de15 може також вносити важливий вклад у рак простати й дольковий рак молочної залози у пацієнтів слов'янського походження з інших країн (алель 657de15 відповідальний за всі випадки Ніймегенського синдрому у всіх слов'янських популяціях, описаних до теперішнього часу).

Таким чином, діагностиці цих видів рака, особливо в даній етнічній групі, може сприяти використання простого аналізу ASO-ПЦР для головної мутації-засновника NBS1. Діагностика раку простати й молочної залози в інших неслов'янських популяціях може бути поліпшена подібним чином.

Ризик раку простати має приблизно 3% населення Польщі з 40млн. людей. З огляду на частоту 2,6% мутації-засновника NBS1 у суб'єктів з раком простати, приблизно в 15000 носіїв NBS1 буде розвиватися рак простати, що становить приблизно 14% всіх чоловіків, уражених мутацією-засновником NBS1. Оскільки була значима відмінність у частоті мутації 657de15 у сімейних випадках у порівнянні із простеженими випадками (відношення $odds = 16$; 95% CI=5,2 до 50; $p < 0,0001$), ризик раку простати вище, якщо родич носія NBS1 уражений раком простати.

Це також перше повідомлення, у якому показано, що мутація NBS1 найбільше ймовірно повертає до долькового підтипу інвазивного рака

молочної залози. Ризик інвазивного долькового рака молочної залози становить приблизно 0,5% серед 20млн. жіночого населення Польщі. З огляду на частоту 8% алеля-засновника NBS1 у суб'єктів з дольковим інвазивним раком молочної залози, приблизно в 8000 жінок-носіїв NBS1 буде розвиватися рак молочної залози, що становить приблизно 8% жінок з мутацією-засновником NBS1.

Середній вік діагнозу рака простати й молочної залози становить відповідно 68 й 58 років. Останній значно нижче (50 років) для раку молочної залози, який діагностується серед носіїв мутації NBS1. Отже, маммографію для жінок, позитивних по мутації NBS1, варто починати раніше, тобто, імовірно, не пізніше, ніж у віці 40 років.

Посилання:

1. Digweed, M. Human genetic instability syndromes: single gene defects with increased risk of cancer. *Toxicol. Lett.*, 67: 259-281, 1993.
2. Futaki, M., Lui, J.M. Chromosome breakage syndromes and the BRCA1 genome surveillance complex. *Trends Mol. Med.*, 7: 560-565, 2001.
3. Varon, R., et al., Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell*, 93: 467-76, 1998.
4. Carney, J.P., et al., The hMRE11/hRAD50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell*, 93: 477-86, 1998.
5. Varon, R., et al. Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657de15, in three Slav populations. *Eur. J Hum. Genet.*, 8: 900-902, 2000.
6. Seemanova, E. An increased risk for malignant neoplasms in heterozygotes for a syndrome of microcephaly, normal intelligence, growth retardation, remarkable facies, immunodeficiency and chromosomal instability. *Mutat. Res.*, 238: 321-4, 1990.
7. Gorski, B., et al., Germline 657de15 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients. *Int. J. Cancer*, 106: 379-81, 2003.
8. Debniak, T., et al., J. Germline 657de15 mutation in the NBS1 gene in patients with malignant melanoma of the skin. *Melanoma Res.*, 13: 365-370, 2003.
9. Cybulski C, et al., NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res.* 2004 Feb 15; 64(4): 1215-9.
10. van der Burgt et al., Nijmegen breakage syndrome. *J. Med. Genet.*, 33: 153-6, 1996.
11. Plisiecka-HaLasa, J. et al., Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) alterations and its protein (nibrin) expression in human ovarian tumours. *Ann. Hum. Genet.*, 66: 353-9, 2002.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110 Поморська Академія Медична
ЦИВУЛСКИ Цезар
ЛЮБІНСКИ Ян
ГОРСКИ Богдан
ГЛІНЕВІЧ Бартоломей
СІКОРСКИ Анджей
Поліморфізм людського гену NBS1, що використовується при діагностиці успадкованої
скхильності до раку простати та лобулярного поліферуючого раку грудей
PZ/0104/RW/PCT

<120
pred

<130

<150> PL 360 642

<151> 2003-06-12

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2265

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (2265)

<223> кДНК білку NBS1

<400> 1

atg tgg aaa ctg ctg ccc gcc gcg ggc ccg gca gga gga gaa cca tac	48
Met Trp Lys Leu Leu Pro Ala Ala Gly Pro Ala Gly Gly Glu Pro Tyr	
1 5 10 15	
aga ctt ttg act ggc gtt gag tac gtt gtt gga agg aaa aac tgt gcc	96
Arg Leu Leu Thr Gly Val Glu Tyr Val Val Gly Arg Lys Asn Cys Ala	
20 25 30	
att ctg att gaa aat gat cag tcc atc agc cga aat cat gct gtg tta	144
Ile Leu Ile Glu Asn Asp Gln Ser Ile Ser Arg Asn His Ala Val Leu	
35 40 45	
act gct aac ttt tct gta acc aac ctg agt caa aca gat gaa atc cct	192
Thr Ala Asn Phe Ser Val Thr Asn Leu Ser Gln Thr Asp Glu Ile Pro	
50 55 60	
gta ttg aca tta aaa gat aat tct aag tat ggt acc ttt gtt aat gag	240
Val Leu Thr Leu Lys Asp Asn Ser Lys Tyr Gly Thr Phe Val Asn Glu	
65 70 75 80	
gaa aaa atg cag aat ggc ttt tcc cga act ttg aag tcc ggg gat ggt	288
Glu Lys Met Gln Asn Gly Phe Ser Arg Thr Leu Lys Ser Gly Asp Gly	
85 90 95	
att act ttt gga gtg ttt gga agt aaa ttc aga ata gag tat gag cct	336
Ile Thr Phe Gly Val Phe Gly Ser Lys Phe Arg Ile Glu Tyr Glu Pro	
100 105 110	
ttg gtt gca tgc tct tct tgt tta gat gtc tct ggg aaa act gct tta	384
Leu Val Ala Cys Ser Ser Cys Leu Asp Val Ser Gly Lys Thr Ala Leu	
115 120 125	
aat caa gct ata ttg caa ctt gga gga ttt act gta aac aat tgg aca	432
Asn Gln Ala Ile Leu Gln Leu Gly Gly Phe Thr Val Asn Asn Trp Thr	
130 135 140	
gaa gaa tgc act cac ctt gtc atg gta tca gtg aaa gtt acc att aaa	480
Glu Glu Cys Thr His Leu Val Met Val Ser Val Lys Val Thr Ile Lys	
145 150 155 160	
aca ata tgt gca ctc att tgt gga cgt cca att gta aag cca gaa tat	528
Thr Ile Cys Ala Leu Ile Cys Gly Arg Pro Ile Val Lys Pro Glu Tyr	
165 170 175	
ttt act gaa ttc ctg aaa gca gtt gag tcc aag aag cag cct cca caa	576
Phe Thr Glu Phe Leu Lys Ala Val Glu Ser Lys Lys Gln Pro Pro Gln	
180 185 190	
att gaa agt ttt tac cca cct ctt gat gaa cca tct att gga agt aaa	624
Ile Glu Ser Phe Tyr Pro Pro Leu Asp Glu Pro Ser Ile Gly Ser Lys	
195 200 205	

aat gtt gat ctg tca gga cgg cag gaa aga aaa caa atc ttc aaa ggg	672
Asn Val Asp Leu Ser Gly Arg Gln Glu Arg Lys Gln Ile Phe Lys Gly	
210 215 220	
aaa aca ttt ata ttt ttg aat gcc aaa cag cat aag aaa ttg agt tcc	720
Lys Thr Phe Ile Phe Leu Asn Ala Lys Gln His Lys Lys Leu Ser Ser	
225 230 235 240	
gca gtt gtc ttt gga ggt ggg gaa gct agg ttg ata aca gaa gag aat	768
Ala Val Val Phe Gly Gly Glu Ala Arg Leu Ile Thr Glu Glu Asn	
245 250 255	
gaa gaa gaa cat aat ttc ttt ttg gct ccg gga acg tgt gtt gtt gat	816
Glu Glu Glu His Asn Phe Phe Leu Ala Pro Gly Thr Cys Val Val Asp	
260 265 270	
aca gga ata aca aac tca cag acc tta att cct gac tgt cag aag aaa	864
Thr Gly Ile Thr Asn Ser Gln Thr Leu Ile Pro Asp Cys Gln Lys Lys	
275 280 285	
tggt att cag tca ata atg gat atg ctc caa agg caa ggt ctt aga cct	912
Trp Ile Gln Ser Ile Met Asp Met Leu Gln Arg Gln Gly Leu Arg Pro	
290 295 300	
att cct gaa gca gaa att gga ttg gcg gtg att ttc atg act aca aag	960
Ile Pro Glu Ala Glu Ile Gly Leu Ala Val Ile Phe Met Thr Thr Lys	
305 310 315 320	
aat tac tgt gat cct cag ggc cat ccc agt aca gga tta aag aca aca	1008
Asn Tyr Cys Asp Pro Gln Gly His Pro Ser Thr Gly Leu Lys Thr Thr	
325 330 335	
act cca gga cca agc ctt tca caa ggc gtg tca gtt gat gaa aaa cta	1056
Thr Pro Gly Pro Ser Leu Ser Gln Gly Val Ser Val Asp Glu Lys Leu	
340 345 350	
atg cca agc gcc cca gtg aac act aca aca tac gta gct gac aca gaa	1104
Met Pro Ser Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Tyr Val Ala Asp Thr Glu	
355 360 365	
tca gag caa gca gat aca tgg gat ttg agt gaa agg oca aaa gaa atc	1152
Ser Glu Gln Ala Asp Thr Trp Asp Leu Ser Glu Arg Pro Lys Glu Ile	
370 375 380	
aaa gtc tcc aaa atg gaa caa aaa ttc aga atg ctt tca caa gat gca	1200
Lys Val Ser Lys Met Glu Gln Lys Phe Arg Met Leu Ser Gln Asp Ala	
385 390 395 400	
ccc act gta aag gag tcc tgc aaa aca agc tct aat aat aat agt atg	1248
Pro Thr Val Lys Glu Ser Cys Lys Thr Ser Ser Asn Asn Asn Ser Met	
405 410 415	
gta tca aat act ttg gct aag atg aga atc oca aac tat cag ctt tca	1296
Val Ser Asn Thr Leu Ala Lys Met Arg Ile Pro Asn Tyr Gln Leu Ser	
420 425 430	
cca act aaa ttg cca agt ata aat aaa agt aaa gat agg gct tct cag	1344
Pro Thr Lys Leu Pro Ser Ile Asn Lys Ser Lys Asp Arg Ala Ser Gln	
435 440 445	
cag cag cag acc aac tcc atc aga aac tac ttt cag ccg tct acc aaa	1392
Gln Gln Gln Thr Asn Ser Ile Arg Asn Tyr Phe Gln Pro Ser Thr Lys	
450 455 460	
aaa agg gaa agg gat gaa gaa aat caa gaa atg tct tca tgc aaa tca	1440
Lys Arg Glu Arg Asp Glu Glu Asn Gln Glu Met Ser Ser Cys Lys Ser	
465 470 475 480	
gca aga ata gaa acg tct tgt tct ctt tta gaa caa aca caa cct gct	1488
Ala Arg Ile Glu Thr Ser Cys Ser Leu Leu Glu Gln Thr Gln Pro Ala	
485 490 495	
aca ccc tca ttg tgg aaa aat aag gag cag cat cta tct gag aat gag	1536
Thr Pro Ser Leu Trp Lys Asn Lys Glu Gln His Leu Ser Glu Asn Glu	
500 505 510	
cct gtg gac aca aac tca gac aat aac tta ttt aca gat aca gat tta	1584
Pro Val Asp Thr Asn Ser Asp Asn Asn Leu Phe Thr Asp Thr Asp Leu	
515 520 525	
aaa tct att gtg aaa aat tct gcc agt aaa tct cat gct gca gaa aag	1632
Lys Ser Ile Val Lys Asn Ser Ala Ser Lys Ser His Ala Ala Glu Lys	

530	535	540	
cta aga tca aat aaa aaa agg gaa atg gat gat gtg gcc ata gaa gat			1680
Leu Arg Ser Asn Lys Lys Arg Glu Met Asp Asp Val Ala Ile Glu Asp			
545	550	555	560
gaa gta ttg gaa cag tta ttc aag gac aca aaa cca gag tta gaa att			1728
Glu Val Leu Glu Gln Leu Phe Lys Asp Thr Lys Pro Glu Leu Glu Ile			
565	570	575	
gat gtg aaa gtt caa aaa cag gag gaa gat gtc aat gtt aga aaa agg			1776
Asp Val Lys Val Gln Lys Gln Glu Glu Asp Val Asn Val Arg Lys Arg			
580	585	590	
cca agg atg gat ata gaa aca aat gac aot ttc agt gat gaa gca gta			1824
Pro Arg Met Asp Ile Glu Thr Asn Asp Thr Phe Ser Asp Glu Ala Val			
595	600	605	
cca gaa agt agc aaa ata tct caa gaa aat gaa att ggg aag aaa cgt			1872
Pro Glu Ser Ser Lys Ile Ser Gln Glu Asn Glu Ile Gly Lys Lys Arg			
610	615	620	
gaa ctc aag gaa gac tca cta tgg tca gct aaa gaa ata tct aac aat			1920
Glu Leu Lys Glu Asp Ser Leu Trp Ser Ala Lys Glu Ile Ser Asn Asn			
625	630	635	640
gac aaa ctt cag gat gat agt gag atg ctt cca aaa aag ctg tta ttg			1968
Asp Lys Leu Gln Asp Asp Ser Glu Met Leu Pro Lys Lys Leu Leu Leu			
645	650	655	
act gaa ttt aga tca ctg gtg att aaa aac tct act tcc aga aat cca			2016
Thr Glu Phe Arg Ser Leu Val Ile Lys Asn Ser Thr Ser Arg Asn Pro			
660	665	670	
tct ggc ata aat gat gat tat ggt caa cta aaa aat ttc aag aaa ttc			2064
Ser Gly Ile Asn Asp Asp Tyr Gly Gln Leu Lys Asn Phe Lys Lys Phe			
675	680	685	
aaa aag gtc aca tat oct gga gca gga aaa ctt cca cac atc att gga			2112
Lys Lys Val Thr Tyr Pro Gly Ala Gly Lys Leu Pro His Ile Ile Gly			
690	695	700	
gga tca gat cta ata gct cat cat gct cga aag aat aca gaa cta gaa			2160
Gly Ser Asp Leu Ile Ala His His Ala Arg Lys Asn Thr Glu Leu Glu			
705	710	715	720
gag tgg cta agg cag gaa atg gag gta caa aat caa cat gca aaa gaa			2208
Glu Trp Leu Arg Gln Glu Met Glu Val Gln Asn Gln His Ala Lys Glu			
725	730	735	
gag tct ctt gct gat gat ctt ttt aga tac aat cct tat tta aaa agg			2256
Glu Ser Leu Ala Asp Asp Leu Phe Arg Tyr Asn Pro Tyr Leu Lys Arg			
740	745	750	
aga aga taa			2265
Arg Arg			
<p><210> 2</p> <p><211> 754</p> <p><212> IPT</p> <p><213> Homo sapiens</p> <p><400> 2</p>			
Met Trp Lys Leu Leu Pro Ala Ala Gly Pro Ala Gly Gly Glu Pro Tyr			
1	5	10	15
Arg Leu Leu Thr Gly Val Glu Tyr Val Val Gly Arg Lys Asn Cys Ala			
20	25	30	
Ile Leu Ile Glu Asn Asp Gln Ser Ile Ser Arg Asn His Ala Val Leu			
35	40	45	
Thr Ala Asn Phe Ser Val Thr Asn Leu Ser Gln Thr Asp Glu Ile Pro			
50	55	60	
Val Leu Thr Leu Lys Asp Asn Ser Lys Tyr Gly Thr Phe Val Asn Glu			
65	70	75	80
Glu Lys Met Gln Asn Gly Phe Ser Arg Thr Leu Lys Ser Gly Asp Gly			
85	90	95	
Ile Thr Phe Gly Val Phe Gly Ser Lys Phe Arg Ile Glu Tyr Glu Pro			
100	105	110	

Leu	Val	Ala	Cys	Ser	Ser	Cys	Leu	Asp	Val	Ser	Gly	Lys	Thr	Ala	Leu
		115					120					125			
Asn	Gln	Ala	Ile	Leu	Gln	Leu	Gly	Gly	Phe	Thr	Val	Asn	Asn	Trp	Thr
	130					135					140				
Glu	Glu	Cys	Thr	His	Leu	Val	Met	Val	Ser	Val	Lys	Val	Thr	Ile	Lys
145					150					155					160
Thr	Ile	Cys	Ala	Leu	Ile	Cys	Gly	Arg	Pro	Ile	Val	Lys	Pro	Glu	Tyr
				165					170					175	
Phe	Thr	Glu	Phe	Leu	Lys	Ala	Val	Glu	Ser	Lys	Lys	Gln	Pro	Pro	Gln
			180					185					190		
Ile	Glu	Ser	Phe	Tyr	Pro	Pro	Leu	Asp	Glu	Pro	Ser	Ile	Gly	Ser	Lys
		195					200					205			
Asn	Val	Asp	Leu	Ser	Gly	Arg	Gln	Glu	Arg	Lys	Gln	Ile	Phe	Lys	Gly
	210					215					220				
Lys	Thr	Phe	Ile	Phe	Leu	Asn	Ala	Lys	Gln	His	Lys	Lys	Leu	Ser	Ser
225					230					235					240
Ala	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Glu	Ala	Arg	Leu	Ile	Thr	Glu	Glu	Asn
				245					250					255	
Glu	Glu	Glu	His	Asn	Phe	Phe	Leu	Ala	Pro	Gly	Thr	Cys	Val	Val	Asp
			260				265					270			
Thr	Gly	Ile	Thr	Asn	Ser	Gln	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp	Cys	Gln	Lys	Lys
		275					280					285			
Trp	Ile	Gln	Ser	Ile	Met	Asp	Met	Leu	Gln	Arg	Gln	Gly	Leu	Arg	Pro
	290					295					300				
Ile	Pro	Glu	Ala	Glu	Ile	Gly	Leu	Ala	Val	Ile	Phe	Met	Thr	Thr	Lys
305					310					315					320
Asn	Tyr	Cys	Asp	Pro	Gln	Gly	His	Pro	Ser	Thr	Gly	Leu	Lys	Thr	Thr
				325					330					335	
Thr	Pro	Gly	Pro	Ser	Leu	Ser	Gln	Gly	Val	Ser	Val	Asp	Glu	Lys	Leu
			340					345				350			
Met	Pro	Ser	Ala	Pro	Val	Asn	Thr	Thr	Thr	Tyr	Val	Ala	Asp	Thr	Glu
		355					360					365			
Ser	Glu	Gln	Ala	Asp	Thr	Trp	Asp	Leu	Ser	Glu	Arg	Pro	Lys	Glu	Ile
	370					375					380				
Lys	Val	Ser	Lys	Met	Glu	Gln	Lys	Phe	Arg	Met	Leu	Ser	Gln	Asp	Ala
385					390					395					400
Pro	Thr	Val	Lys	Glu	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Ser	Asn	Asn	Asn	Ser	Met
				405					410					415	
Val	Ser	Asn	Thr	Leu	Ala	Lys	Met	Arg	Ile	Pro	Asn	Tyr	Gln	Leu	Ser
			420					425					430		
Pro	Thr	Lys	Leu	Pro	Ser	Ile	Asn	Lys	Ser	Lys	Asp	Arg	Ala	Ser	Gln
		435					440					445			
Gln	Gln	Gln	Thr	Asn	Ser	Ile	Arg	Asn	Tyr	Phe	Gln	Pro	Ser	Thr	Lys
	450					455					460				
Lys	Arg	Glu	Arg	Asp	Glu	Glu	Asn	Gln	Glu	Met	Ser	Ser	Cys	Lys	Ser
465					470					475					480
Ala	Arg	Ile	Glu	Thr	Ser	Cys	Ser	Leu	Leu	Glu	Gln	Thr	Gln	Pro	Ala
				485					490					495	
Thr	Pro	Ser	Leu	Trp	Lys	Asn	Lys	Glu	Gln	His	Leu	Ser	Glu	Asn	Glu
			500					505					510		
Pro	Val	Asp	Thr	Asn	Ser	Asp	Asn	Asn	Leu	Phe	Thr	Asp	Thr	Asp	Leu
		515					520					525			
Lys	Ser	Ile	Val	Lys	Asn	Ser	Ala	Ser	Lys	Ser	His	Ala	Ala	Glu	Lys
	530					535					540				
Leu	Arg	Ser	Asn	Lys	Lys	Arg	Glu	Met	Asp	Asp	Val	Ala	Ile	Glu	Asp
545					550					555					560
Glu	Val	Leu	Glu	Gln	Leu	Phe	Lys	Asp	Thr	Lys	Pro	Glu	Leu	Glu	Ile
				565					570					575	
Asp	Val	Lys	Val	Gln	Lys	Gln	Glu	Glu	Asp	Val	Asn	Val	Arg	Lys	Arg
			580					585					590		
Pro	Arg	Met	Asp	Ile	Glu	Thr	Asn	Asp	Thr	Phe	Ser	Asp	Glu	Ala	Val
		595					600					605			

```

Pro Glu Ser Ser Lys Ile Ser Gln Glu Asn Glu Ile Gly Lys Lys Arg
  610          615          620
Glu Leu Lys Glu Asp Ser Leu Trp Ser Ala Lys Glu Ile Ser Asn Asn
  625          630          635          640
Asp Lys Leu Gln Asp Asp Ser Glu Met Leu Pro Lys Lys Leu Leu Leu
          645          650          655
Thr Glu Phe Arg Ser Leu Val Ile Lys Asn Ser Thr Ser Arg Asn Pro
          660          665          670
Ser Gly Ile Asn Asp Asp Tyr Gly Gln Leu Lys Asn Phe Lys Lys Phe
          675          680          685
Lys Lys Val Thr Tyr Pro Gly Ala Gly Lys Leu Pro His Ile Ile Gly
          690          695          700
Gly Ser Asp Leu Ile Ala His His Ala Arg Lys Asn Thr Glu Leu Glu
  705          710          715          720
Glu Trp Leu Arg Gln Glu Met Glu Val Gln Asn Gln His Ala Lys Glu
          725          730          735
Glu Ser Leu Ala Asp Asp Leu Phe Arg Tyr Asn Pro Tyr Leu Lys Arg
          740          745          750
Arg Arg

```

```

<210> 3
<211> 2260
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(702)
<223> КДНК усиченого білку NBS1 in
<400> 3

```

```

atg tgg aaa ctg ctg ccc gcc gcg ggc ccg gca gga gga gaa cca tac      48
Met Trp Lys Leu Leu Pro Ala Ala Gly Pro Ala Gly Gly Glu Pro Tyr
  1          5          10          15
aga ctt ttg act ggc gtt gag tac gtt gtt gga agg aaa aac tgt gcc      96
Arg Leu Leu Thr Gly Val Glu Tyr Val Val Gly Arg Lys Asn Cys Ala
          20          25          30
att ctg att gaa aat gat cag tcg atc agc cga aat cat gct gtg tta      144
Ile Leu Ile Glu Asn Asp Gln Ser Ile Ser Arg Asn His Ala Val Leu
          35          40          45
act gct aac ttt tct gta acc aac ctg agt caa aca gat gaa atc cct      192
Thr Ala Asn Phe Ser Val Thr Asn Leu Ser Gln Thr Asp Glu Ile Pro
          50          55          60
gta ttg aca tta aaa gat aat tct aag tat ggt acc ttt gtt aat gag      240
Val Leu Thr Leu Lys Asp Asn Ser Lys Tyr Gly Thr Phe Val Asn Glu
  65          70          75          80
gaa aaa atg cag aat ggc ttt tcc cga act ttg aag tcg ggg gat ggt      288
Glu Lys Met Gln Asn Gly Phe Ser Arg Thr Leu Lys Ser Gly Asp Gly
          85          90          95
att act ttt gga gtg ttt gga agt aaa ttc aga ata gag tat gag cct      336
Ile Thr Phe Gly Val Phe Gly Ser Lys Phe Arg Ile Glu Tyr Glu Pro
          100          105          110
ttg gtt gca tgc tct tct tgt tta gat gtc tct ggg aaa act gct tta      384
Leu Val Ala Cys Ser Ser Cys Leu Asp Val Ser Gly Lys Thr Ala Leu
          115          120          125
aat caa gct ata ttg caa ctt gga gga ttt act gta aac aat tgg aca      432
Asn Gln Ala Ile Leu Gln Leu Gly Gly Phe Thr Val Asn Asn Trp Thr
          130          135          140
gaa gaa tgc act cac ctt gtc atg gta tca gtg aaa gtt acc att aaa      480
Glu Glu Cys Thr His Leu Val Met Val Ser Val Lys Val Thr Ile Lys
  145          150          155          160
aca ata tgt gca ctc att tgt gga cgt cca att gta aag cca gaa tat      528
Thr Ile Cys Ala Leu Ile Cys Gly Arg Pro Ile Val Lys Pro Glu Tyr
          165          170          175

```

```

ttt act gaa ttc ctg aaa gca gtt gag tcc aag aag cag cct cca caa 576
Phe Thr Glu Phe Leu Lys Ala Val Glu Ser Lys Lys Gln Pro Pro Gln
      180      185      190
att gaa agt ttt tac cca cct ctt gat gaa cca tct att gga agt aaa 624
Ile Glu Ser Phe Tyr Pro Pro Leu Asp Glu Pro Ser Ile Gly Ser Lys
      195      200      205
aat gtt gat ctg tca gga cgg cag gaa aga aat ctt caa agg gaa aac 672
Asn Val Asp Leu Ser Gly Arg Gln Glu Arg Asn Leu Gln Arg Glu Asn
      210      215      220
att tat att ttt gaa tgc caa aca gca taa gaaattgagt tccgcagttg 722
Ile Tyr Ile Phe Glu Cys Gln Thr Ala
225      230
tctttggagg tggggaagct aggttgataa cagaagagaa tgaagaagaa cataatttct 782
ttttggctcc ggggaacgtgt gttgttgata caggaataac aaactcacag accttaattc 842
ctgactgtca gaagaaatgg attcagtcaa taatggatat gtcctaaagg caaggtctta 902
gacctattcc tgaagcagaa attggattgg cgggtgatttt catgactaca aagaattact 962
gtgatcctca gggccatccc agtacaggat taaagacaac aactccagga ccaagccttt 1022
cacaaggcgt gtcagttgat gaaaaactaa tgccaagcgc cccagtgaac actacaacat 1082
acgtagctga cacagaatca gagcaagcag atacatggga tttgagtga aggccaaaag 1142
aaatcaaaag ctccaaaatg gaacaaaat tcagaatgct ttcacaagat gcacccactg 1202
taaaggagtc ctgcaaaaaca agctctaata ataatagtat ggtatcaaat actttggcta 1262
agatgagaat cccaaactat cagctttcac caactaaatt gccaaagtata aataaaagta 1322
aagatagggc ttctcagcag cagcagacca actccatcag aaactacttt cagccgtcta 1382
ccaaaaaag ggaagggat gaagaaaatc aagaaatgct ttcattgcaa tcagcaagaa 1442
tagaaacgtc ttgttctctt tttagaacia cacaacctgc tacacctca ttgtggaaaa 1502
ataaggagca gcattctatct gagaatgagc ctgtggacac aaactcagac aataacttat 1562
ttacagatac agatttaaaa tctattgtga aaaattctgc cagtaaatct catgctgcag 1622
aaaagctaag atcaataaaa aaaagggaaz tggatgatgt ggccatagaa gatgaagat 1682
tggaacagtt attcaaggac acaaaaccag agttagaaat tgatgtgaaa gttcaaaaac 1742
aggaggaaga tgtcaatgtt agaaaaaggc caaggatgga tatagaaaca aatgacactt 1802
tcagtgatga agcagtagca gaaagtagca aaatatctca agaaaatgaa attgggaaga 1862
aacgtgaact caaggaagac tcactatggt cagctaaaga aatatctaac aatgacaaac 1922
ttcaggatga tagtgagatg cttccaaaaa agctgttatt gactgaattt agatcaactg 1982
tgattaaaaa ctctacttcc agaaatccat ctggcataaa tgatgattat ggtcaactaa 2042
aaaatttcaa gaaattcaaa aaggtcacat atcctggagc aggaaaactt ccacacatca 2102
ctggaggatc agatctaata gctcatcatg ctgaaaagaa tacagaacta gaagagtggc 2162
taaggcagga aatggaggta caaatcaac atgcaaaaaga agagtctctt gctgatgatc 2222
tttttagata caatccttat ttaaaaagga gaagataa 2260
<210> 4
<211> 233
<212> NPT
<213> Homo sapiens
<400> 4
Met Trp Lys Leu Leu Pro Ala Ala Gly Pro Ala Gly Gly Glu Pro Tyr
1      5      10      15
Arg Leu Leu Thr Gly Val Glu Tyr Val Val Gly Arg Lys Asn Cys Ala
      20      25      30
Ile Leu Ile Glu Asn Asp Gln Ser Ile Ser Arg Asn His Ala Val Leu
      35      40      45
Thr Ala Asn Phe Ser Val Thr Asn Leu Ser Gln Thr Asp Glu Ile Pro
      50      55      60
Val Leu Thr Leu Lys Asp Asn Ser Lys Tyr Gly Thr Phe Val Asn Glu
      65      70      75      80
Glu Lys Met Gln Asn Gly Phe Ser Arg Thr Leu Lys Ser Gly Asp Gly
      85      90      95
Ile Thr Phe Gly Val Phe Gly Ser Lys Phe Arg Ile Glu Tyr Glu Pro
      100      105      110
Leu Val Ala Cys Ser Ser Cys Leu Asp Val Ser Gly Lys Thr Ala Leu
      115      120      125
Asn Gln Ala Ile Leu Gln Leu Gly Gly Phe Thr Val Asn Asn Trp Thr
      130      135      140
Glu Glu Cys Thr His Leu Val Met Val Ser Val Lys Val Thr Ile Lys

```

145		150		155		160
Thr Ile Cys Ala Leu	Ile Cys Gly Arg Pro	Ile Val Lys Pro Glu Tyr				
	165	170		175		
Phe Thr Glu Phe Leu	Lys Ala Val Glu Ser	Lys Lys Gln Pro Pro Gln				
	180	185		190		
Ile Glu Ser Phe Tyr	Pro Pro Leu Asp Glu	Pro Ser Ile Gly Ser Lys				
	195	200		205		
Asn Val Asp Leu Ser	Gly Arg Gln Glu Arg	Asn Leu Gln Arg Glu Asn				
	210	215		220		
Ile Tyr Ile Phe Glu	Cys Gln Thr Ala					
225	230					

<210> 5
 <211> 56495
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> ген
 <222> (1)..(56495)
 <223> алель гену NBS1, що містить мутацію 657del5

<400> 5
 gcaaaactagc ctagaacctg tcatgggaag ctgtggtcta ggggtgacagc aaagtttcat 60
 ttaaggcaag atgtaaaggg aagactctgt caagacccta aagatttaga agagtttgtt 120
 tataccatga cagagggtgag aggagatgcc agcaaggtag aagaagcagg gagcatggag 180
 caataagcag accaatttgc taccaaaagc aaaccttatt tgcattcatgc tctctttcaa 240
 tttttttctg ggctctgatt attagacctg tgttgttacc aagcaacaga tagaaattgt 300
 gggatctgtt ttccttcac acctctgccac taccatcttt catcctggca atcagacaat 360
 aagttgggct aagttatagt atttccagc agggaagaac tgggcctgat aaaggaagga 420
 ggtggcttta ccagaaagga gctgtagaac cctgccaaac tgaagcagct ggaacaagac 480
 agtactgatg ggactgcctt ctgaggatgc tgaacaaaag gagagtggaa agtaaatattg 540
 tatgagagag tttattgatt tgagagcagt ctccaggag agaggatcga acattccagc 600
 aaggactctg ggaaacattg ctatcatgct tctatgacgg ctttttagaag tttgtggaaa 660
 agtgggtggc cagcetaaga gaagtaaaa tgccacagct gccatggcag atggtagaag 720
 tagggatcaa actgctcagg gaaatgggta tgctacagtg gccatattat gtacggctgg 780
 aaacccccca gatgtcaaaa ttcagttca gatgtgccat ttattaaaga gacatggaat 840
 tctctggtga gaagggtacc agcatcactg agaagctcag tggtaggtct cctctgtagg 900
 tcatggttga tgataaaaga tgctgttatg gaattgagtt ccagatagg actggggata 960
 atagaatcct gacatgatag aggccagctg gtggtactta accatccgaa tgggtataatt 1020
 atcttgatg gcaagattga agtggcagca gagctctcga ccagagtgga gcttaaaaga 1080
 tgcttaatag aataaggcac ccctgtgggg aaagacagtt aaccaagagt aaactcaatc 1140
 tgttcagtga acaggtatca agaattggaag acacaaggct cagagcagca gctcaacaa 1200
 aaagtccagc tctctttccg aatttccctga tttgagccac tttgccaatc cagaacccat 1260
 tgactgggtg agaggcagga ctgccagtaa gaaggacct gcaatcccat agcaagata 1320
 tatggtaatg acctccccc accccacct actctcagtc tttcccttaa gggacctata 1380
 gccattcgtc tggaaaatca tacactgagg aaaagagaat gcccataac ttggagggct 1440
 gtgggacatg atcattattg ataccatga acccaaaata ttatgactcc tgggtaaagc 1500
 agaggtattc agaagccaga gagttaaggg agtccttgte caggtctggc atacagtggg 1560
 tccaccgaac acatagaact acgtgggtgt cattttccta gttcccaaat atataattga 1620
 aatgaacatc cttggtagtt cttacaatac ccacctcagc tcttggcct gtagggttag 1680
 aactatcaac gggggcaagg ccaacaggga gcagcctcaa attgtacagc catgacagtg 1740
 agcaagaaca atatagggga atgatagata ttagtgtctt ctttttggt ccctttttat 1800
 ctccatttaa ttcattatca ttgaacctaa aaagcctaac agttcctgga gaataaacag 1860
 cagactactg caatcaacaa agtaataacc ocaattagag ctgctgtacc agatgtgaaa 1920
 tctttacaag agcagaacaa catgaacctc ggcaacagg tgggggtgat tgatatgatg 1980
 acatgtgctt ccccaacctt aacagaaagt agaattccaa agtgcctata ttttaattaga 2040
 aaaaataata gaaaataact gcaatgttga ccagagcta agctgtatct ccttaacctc 2100
 tatcataatg tattcccaag agacctgaag tgtctggaca tgctgcagaa catccactgt 2160
 tctactacag ttgtggtatt atgctacca tgatggatga gtaaggattt ggcaaacagg 2220
 ttgaggcct ttgtgagata tgtatacttc agaattgtga agaaaattcc tgcaaaatgt 2280
 tgatgcttca ctaaactcag gaaatttagg gattctatga tgcaggggcat acttttgtgt 2340
 gtccacttta agaaagatct gctactttg aatcatgtt ttcttccact aatattttat 2400
 attttacttt cctatgtaaa taatgattca tctggaattt agatgaattc taattcatct 2460
 aatgaatta gggggatcag tcttcatttc ctgtgttatg ttaacacatt tcttgtgtca 2520

cgtaaataaa	cgggatcatt	tatttctggg	gtgggggtggg	gtcacatgag	actttccctt	2580
gttgccctgt	aatcaccttc	gaaaaatcaa	attaccttat	gtgtccactt	tttttaggtc	2640
cctctattct	gactcatttg	cctgttttct	atccttgtag	caagcaaaca	ctgacttaat	2700
aactgttaact	ttataataga	totttagtatt	tcataattta	aatattccag	ctttgttctt	2760
caaaattgcc	ttggctattc	taggcatttg	catttccata	taaatgttag	aatctgctca	2820
tccattttcta	ctcaaaaaaa	gcatttgaga	ttgctgaagt	tacattgaat	ctatagaaca	2880
attttggggg	aaatgacatc	ttaacaatct	gtgaacatga	tccattatcc	ttgcatttat	2940
ttaggacttt	ttaaactttc	tgtcaataat	gttatgtagt	caatcatggt	ttgtattaca	3000
tagtttgatc	gatgtattac	caagcactcg	attattttgg	tgccattata	attaaacatg	3060
taattttcta	tttattttct	ggaataaagg	tatacaatta	aattttgtat	ctagatattg	3120
tatctataac	cttatttaaat	tcattttatta	attaaaaatag	tttgccaaca	gtttttttga	3180
ttttcaatat	aggcaatcgt	gtaattttgtg	aataatgact	gttattttct	cctttccaat	3240
ctgaatgtct	tttgttactc	tttctccttt	attgcattgg	ctagagcatc	taaagccatg	3300
ctgaaaataa	gtggtaagag	cgtgtacatc	cttgtttcat	tactgatgtc	atggggaaat	3360
gttcaataat	ttaccttaag	tataacgtaa	actgtagttt	tttttgtaaa	tgtcctttat	3420
cagatcatgg	atgtttttct	tattcctact	ttgcagagag	gtttttatcc	taaatgggtg	3480
cttaacttta	tcaattttct	tgtactatc	aagataatca	tgatttttct	cctattttaa	3540
attattatga	tgaattacat	ttattttttc	ccccaatgtt	aaccaccctt	tttgtttctg	3600
gataaatctc	acttagttat	gattattctt	tttatactac	tactgtatc	aattttgctaa	3660
tattgtgctt	aggagtgttg	atctatgatg	ataagagatt	ggtaaaccag	cctttttttt	3720
tttttttttt	tgagacaggg	tcttgctcta	tgcgccaggc	tagagtgcag	tggcatgatc	3780
atggctcact	gcagcatcga	actcctgggc	tcaagtgtat	cttctgctc	agcctcctga	3840
gtagctggga	atacaggagc	atggcaccaa	gcctgtctaa	ctttaaaatt	ttttataaag	3900
acagggtctt	gccatgttgc	ccatgctgat	cttgaactcc	tggcctcaag	tgatcctccc	3960
atcttggcct	cccagactgc	tgggattaaa	ggagcagagc	atgggtgctg	gcctaaacaa	4020
gcctttttta	agtgaacttt	ccccctatt	acagaatgct	tttgaaagcc	aaaatgtatg	4080
tgatcaggag	tgtgctctca	gatgtttatt	tagtagtgcg	caggatgtag	actacattat	4140
gtgggacgtg	ggttggtgatg	ggttggaag	ctactggaat	taggaggaga	gcttgaacca	4200
gcttgagaca	ggttggaagtg	gtattaaata	caggagactg	cccagttatt	cccagttatt	4260
agcatgtgat	tagctgaaag	tgtggcatta	tgaataaaag	acgttaagac	aagttgattt	4320
gaacttagaa	aagagtaaaa	ataatgagtt	tacttcgagg	tgaatcctt	atcttcatca	4380
ttactatcac	cattactaga	ttccaaagga	atacctgcaa	tttaagaaac	tgcaaacgca	4440
cgaactaca	taactggtaa	gtattttaat	gcatttaatt	aaaaattttc	cttattgttc	4500
tttgagttta	gttttttaaaa	ttcttttctg	tcataatcag	gaaaggtagt	aaccttacat	4560
tcagcgacac	cttagaaaca	taccctttta	acgcagcaca	tttcaataca	gattgtgctg	4620
ttctttttcc	aaccaccagg	tggcgggcaa	gcgcccaagt	cgcactcccg	cctcatccaa	4680
ggcagccctg	gtggctcccg	ggagcgcgca	cgtcccgagg	cccatgccga	ccgcaggcgc	4740
cgtatcccg	ctcgtctagc	agcccccgtt	acgcgggtgc	acgtcggccc	cagccctgag	4800
gagccggacc	gatgtggaag	ctgctgcccg	cgcggggccc	ggcaggaggt	aagggcagaa	4860
gggaagcctc	ggggcctatt	ttcccggtag	cgaactgctc	gggggagggc	ctgcccgtga	4920
ttcttgctgc	gctccgcttc	ctgcccgggg	acgtcgcgga	agcggctcga	gaagcggcga	4980
gtacgctgta	tggcaagcgc	atattcttcc	cgggcagcac	ggcggctgtg	agctggaatt	5040
cagcgggggc	ggtgggggtga	ttgcccgcgc	ccctgggtgg	agtcctccgc	gcccctcccc	5100
tgactccccc	tccctcccag	cctcaccccc	gocgcgttgc	agcgtagggt	ctggatggcc	5160
tgcgggttaag	cggcagcagg	cgcctagtgg	gaacccccgg	caggaagtta	gcattggcgg	5220
accacacggg	ggccacacat	gacttgtgaa	gaactactgg	acagtttggg	gaaatgacta	5280
ccacgaaaag	gcttactttc	agttttgttt	cagactcctt	ttccacaatg	tcacagaac	5340
aatgggaaaa	gtcgattttt	tccatttcac	ttccagcggg	gtgaaatgtg	atcacatgtt	5400
aattgggttg	cgtgggtggg	tgtgaagggt	cttgcctcgc	ggaagtttac	atgatgattg	5460
gcaaagatct	atgtagagac	taaatggact	ggcagggtta	gagagtatgg	agagcgccaa	5520
actaaataaa	ttttatactg	tgaagactca	cagggtcaagg	cgtccctgga	gacctggctc	5580
ttctggactc	cctactcttt	atctgcctta	atctccctgc	cactcgggta	atgaaattat	5640
gctcccagac	tcaactccgc	atgtctccaa	tatatatact	gttactccaa	caacttatga	5700
tttacagcaa	ttttaaaaga	aactgataac	cctttcccac	tgattggaga	tgttatcttt	5760
aagataaaaa	caaattttca	aaaaatgtac	acgtgcatct	tagtctggac	tttgttgcat	5820
tgggtctgtg	tgtttactca	tgggtccagta	ccatactttt	agttttatgg	catattttgc	5880
catctggtag	ggcaagctcc	tattatatta	ttcacatttt	tcttgatttt	tttttttttt	5940
tgagacggag	tctcactctg	tcaccgaggc	tggagtgcag	tggcactgtg	tccgctcact	6000
gcaacctcca	tccctgggtg	tcaagcagtt	ctottgcttc	agcctcccaa	gtagctggga	6060
ttacaggctt	gagcatcttt	ttttatagtt	toctgatatt	tttgtttatc	aagttccaaa	6120
cataatattg	tgattgttgc	taggtaatac	attaagtttt	taagttaatt	tgagggaaca	6180
ttgactcctt	tcagcattgc	tttcccttta	gaaaaatgat	gtagccttct	atctgtttat	6240

ataacaccttt	tttcttttttc	tctttttttat	tgtatttttaa	attttgttgt	tgttactcct	6300
gaaacacccat	agttagataa	cctttgatag	ccttcagtga	ggctttactg	aaaacacaag	6360
tttgacatat	gtaaagtga	ctaaccattg	aataacaaag	gtgttttatt	taatatattg	6420
cataacctata	tcatatacac	ttacatgtat	gtgtgtgttc	gtgtacatgt	gtatgtgtct	6480
atcaacttat	cttttttttaa	aaaaaaattt	atctcaggag	aaccatacag	acttttgact	6540
ggcgttgagt	acgttggttg	aaggaaaaac	tgtgccattc	tgattgaaaa	tgatcagtcg	6600
atcagcogaa	atcatgctgt	gttaactgct	aacttttctg	taaccaacct	ggatgtgtac	6660
taatttttatt	tcactagttt	ccagtaaggg	ggttgaaatc	acaaaatatt	ctcttggttt	6720
gtatgtgaga	gagagttcac	aggatttgtc	attttataga	gctgtgtaga	cttttttaat	6780
gttaacaaaa	ttaaataact	atattgtggc	agtggtagca	gtggtagttg	ttcattttga	6840
gatttgaaat	ttctatttca	gtaatttact	ctttgtttta	gttagaaact	cagaggaaat	6900
aggacatagt	tattttttatt	tgcttactaa	acattttattg	tttactatta	gtttgggtga	6960
aaagttaattg	ctgttttttg	cattagcagt	aatgtgtttt	tatgtgtcag	taactgtgcc	7020
aaccctgcga	atagaacaat	gaacagacct	tcagtactct	ggctcttaaa	gagggttatgt	7080
agctgtgtgg	aaacgggcct	ttctcatata	atacaagttt	ttgcaatggg	aattgatttg	7140
ttttattagg	gaaatgctta	cttatgccc	acagctcctt	taaatggctt	tcagtttggt	7200
ttgatcataa	ccttggtgga	taaaagtgtc	aaaaaaaata	cataggaata	tctgtactca	7260
tgataacgct	gggtgtaata	agaaagatga	gccattattt	taatcaaaga	ttgcataat	7320
gogatacgaa	tttcttcagt	tttatttagg	ttttgtttct	gttcttttag	gtatagaaaa	7380
acattttgga	aattttctaca	gaaaaagtaa	aattgttact	gtaagtcaga	aacactagcc	7440
tataacctcg	tattctcatg	ggactaattt	ttacaatgtg	gttttgatac	tgtaaaaaca	7500
acaaaaaaag	atctaggeat	gaaattgtca	tgttttaaat	gaaacagact	gcaccaaagc	7560
aaaaaattct	caaatgtgtg	tgaggggtca	ggagaatccc	cactgactta	cacaaataaa	7620
gaacatgtgt	gttctaggag	gggtattcct	gggttaagaa	acttccctaa	ggggaaatat	7680
gaattgttag	ttgagtgtc	ttctctcaa	ggcaaccgaa	gcagttaattg	ttgtctgccg	7740
tggtgggagg	ttagccacct	gectattgtc	ttttcttttg	aaaacttttt	ctctgagaag	7800
tgaatgtact	gagtggtaaa	agactttaaa	ttatttgcta	acttttcaga	gtcaaacaga	7860
tgaaatccct	gtattgacat	taaaagataa	ttctaagtat	ggtacctttg	ttaatgaggga	7920
aaaaatgcag	aatggctttt	cccgaacttt	gaagtcgggg	gatgggtatta	cttttgagg	7980
gtttggaagt	aaattcaggt	aagacatttt	aaaattgatt	ttaaaatgga	cagctttgtt	8040
tcagccaaat	cctaaaggaa	aatgatattt	ctgattaatg	aatttaaaac	agtataattt	8100
agttcctgct	tagcacagta	ttggactctg	tgccatgggt	ggtgagtga	ttttgtacat	8160
cacggtgatg	agagtttgag	tgggcccgtg	gggacttcat	gggaagttaac	atttcttcga	8220
ttctctcattg	gtgaaggat	aatgttaact	tttggtcatt	gttttttctt	catttggaact	8280
caagacttag	gatttgataa	ttttctagg	tacaaagctt	aatgatgagg	aactgataat	8340
ttcataggtt	acaaagggtg	acaataaata	aaagttacaa	taacagtata	tgatgtgagc	8400
ttaaagtttt	aaagtactaa	aaattgcoat	ctctgcaact	ctgatactat	gactttattt	8460
aacttattct	catttacaga	atagagtatg	agcctttggg	tgcatgctct	tcttgtttag	8520
atgtctctgg	gaaaactgct	ttaaatcaag	ctatattgca	acttgaggga	tttactgtaa	8580
acaattggac	agaagaatgc	actcaccttg	tcattggtatc	agtgaaggtt	accattaaag	8640
taggttgaat	gtcttgttct	tatgttaaaa	ataagttatt	tgaatttaag	cttaccact	8700
atacacagat	ttttttttaa	ttactttaaa	actatcagaa	ctgttagttg	tagatttata	8760
tataccact	ccatcccttt	gtataccatt	taggcttgag	tggcttttca	tataacctgt	8820
ttattatctg	agacaagcca	aaagcaacta	aaattatatt	tcagattttg	tttagcattt	8880
taaaaagcga	ttctgttgtc	cttccaccga	gaaggttatg	acagtgcata	ctttgtgttt	8940
tcagctctaa	agcaacgcaa	ctagagatta	actgccagtc	ttcaaagttt	gcactctcatg	9000
tctttctatc	aagttgtctt	tctccaatct	ccaggtgatt	catctccttt	taaacagggt	9060
gacctataga	tttgtgggat	ccttttaggt	taatatctat	agtaaaaagc	cacaaatact	9120
tagattcoct	tattaaaaat	ccttttagtat	ttaatatatt	ttaactagaa	ttatgtttta	9180
tagctaaaga	gttatcgtgg	agaaaggctt	gccgctcagc	tggaaactcaa	cttgtaactt	9240
ggtgggggtg	tctgtaatac	aggggttttt	tatttttgca	catttatgaa	attgatttta	9300
taaaattcagc	agtgtgatta	gctccagag	tactaatata	tgcatataaa	cttacaataa	9360
gtagattttac	aaatcaaagt	gtccatttat	gggttttcagt	agggatgcac	ctttaccaga	9420
atattttaagt	gtgggcccct	gcacagtcct	ctttaagata	ttacttaaga	aatagagtaa	9480
gtaatcatat	actagcttgg	ttggtgtgaa	atacaatcaa	aggtagttaa	attgtcttga	9540
gagatatttt	actacatctg	tgacagacct	ggacacttcc	agcgagtggg	atgctgatga	9600
ccaccttggtg	aattgctcca	ttacacacac	caactgtggt	tacagagtaa	tttgttaaaa	9660
aaaattcctg	gtcattcata	tgccaaaata	gaaaaccttg	ttgttatatt	tttttttttg	9720
gtaaattttc	tgaaagtaca	gttagcttat	attttttaaa	tcattgaatg	tttagagcaa	9780
aaaggaattt	aaagaccatt	tattcttact	attagotact	taaaaacaac	aacaacaaca	9840
acaacaaaaa	aagcgttcag	ttcaactttt	attttctgaa	gtgtaaaactg	agggcatggac	9900
caattaattt	ccaagtccac	atgtattaga	gtttaccocaa	tacagtgttg	atttgcacat	9960

tactgggttca	tgctagttta	tttctttcac	attggaaagt	ggatctcttc	aggttccatt	10020
cttgagagac	aactctaaatc	tgcttgcccc	tatttagaca	ataaaatacc	ctgtgttatt	10080
gaaagcatat	tcatgggtgg	gtgcagtggc	ttgcgtctgt	aatcccagca	ctttgggatg	10140
ccgaggtggg	aggattgctt	gagcccagga	atttgagacc	agcctgggca	acatagtgag	10200
actccatctc	tacaaaaaat	tttaaaaaat	agctgggtat	gggtggcatgt	gcctgtagt	10260
ccagctactc	aggaggctga	gacaggagga	ttgcttgagc	ccaggaggtt	gaggctgcag	10320
tgaaccagga	tcacgccact	gcagtcacgc	ctggacaaca	gagcgagacc	ctgtctcaaa	10380
aataaaaaag	catatttata	ttattctgaa	tcttattttc	attgcccact	gtagcatttt	10440
ctaattgttg	tcatattttt	tggatgtatc	atatttgagg	cttatagctt	aattcacatg	10500
tgagtttaag	tttctttttt	tccactttat	atgtacttat	tttgtgcttt	taccaaaaaa	10560
tattttattt	actttctcaa	aaaggcctta	ttgcatagtt	acaatctttt	tgaagcaaa	10620
ttagtctaaa	aatagctcat	gttcactctc	taatatgttc	ttccctgaag	cagatatgtt	10680
acatttctct	aattctgaaa	tatattttta	acattttaat	gtctctogaa	gtggaatgca	10740
ttttaaaaat	gaattttatt	ttatgttgtt	ccaccctttc	caaaaaagca	gttttaaaaa	10800
ttagtattat	aatcgggtgac	ttcttataat	tgagtgatta	tactgtgatt	tatgtttcta	10860
aataatgcag	tgaccaaaaga	ccgactctta	ttttatagat	tgtggcttct	ttataaat	10920
agagagatga	aagggaaaac	attatttttt	atggatgtaa	acagcctctt	tgtagtttat	10980
aacttaaaac	ttttctttta	aaaatgctag	catgtgaata	tatatattca	catgttttct	11040
tcattgtaga	caatatgtgc	actcatttgt	ggagctccaa	ttgtaaaagg	agaatatttt	11100
actcaattcc	tgaaagcagt	tgagtcacag	cacaaattga	aaggtatatt	11160	
atgtatttta	aataatacaa	gatgtcactt	atatgatagc	attgattttt	atttaagtta	11220
attccctctt	taatgcttgt	ttcaggatgt	aatagtgtgt	gtgttatagt	tccgtattat	11280
taattggaag	tttttgttta	gtttgtaaag	aaagagtcc	ccaaatttct	ttgttggtta	11340
ttctgtattc	ctgaacaaaa	gtttaaatat	gtgctaatat	ttaaaagaaa	aaatggaaag	11400
acagtaaatg	gcactgaggt	aacctcatgg	tcagaagagc	acatatgtca	gttccaggca	11460
tcacgccaca	gttagctctg	gaattgtgtg	gtgcagcagc	cctctttgca	agccacatag	11520
tccagaatat	taacagcacc	atagcttttg	gaatggagct	tagtttttct	gagctccagt	11580
tactcatatg	aaatttgaga	gtaataccta	ctagctgag	ttaaaagtc	aggaaacac	11640
agatgctggc	gaggctgtgg	agaaataagg	cttttacact	gttggtgggg	gtgtaaat	11700
gttcaaccat	tatggaagac	agtgtggtga	ttccttaagg	atctagaacc	agaaatacca	11760
attgaccag	caatcccat	actgggtata	tacccaaagg	attaaaaatc	attccactgt	11820
aaagacacat	gcacacatat	gtttattgca	gcactattaa	caacagcaaa	gacttggac	11880
caacccaaat	gcccacat	gatagactgg	gtatatgtcc	atacctatgc	acatacac	11940
catggaatac	tatgcagcca	taaaagagaa	tgagttcatg	tcgtttgcag	ggacatggat	12000
gaagctggaa	accatcatct	tcagcaaaact	aacacaggaa	cagaaaaacca	aacaccgtat	12060
gttctcactc	taagtggga	gtggaacaat	gagaacacgt	ggccacaggg	aggggaacat	12120
cacataccgg	ggcctgtttg	gggggtgggg	acaaggggag	ggagagcatt	aggacaaata	12180
cctaattgat	gtgggtctta	aaacctggat	gacaggttga	taggtgcagc	agaccaccat	12240
ggcacatgga	tacctatgta	acaaatctgc	atgttctgca	catgtatccc	agaacttaaa	12300
gtaacattaa	aaaaaaaaat	ttaaatgtta	tgccagttag	gaattttatt	gctaatttta	12360
atgtgttttg	agctgtctata	agctatttgg	cttaattgta	gttttttagg	gactgtttat	12420
accggataac	agctgtctgc	ttttaaaagt	aataaaaaat	caggttttcc	tctttgttta	12480
taatttttat	ctgggaagtt	tttttgtatt	tatactccag	ttggcaggta	atgtgatata	12540
tttgactct	ggaaaaatat	actcagattt	taaaatagaa	gattcttaaa	attttttgag	12600
tccaagaccc	ctcagtatgt	gccaggtctg	cctgacccag	cagacagatg	12660	
acaaatgcac	tcaaacacag	gtatccagtg	aaagagttag	ctagggggct	gggccaccca	12720
cagacactga	ggaggggtgt	gtaaaagagt	agcagccgcg	gtcccagacta	gctgttgctg	12780
tggtcattta	ttcagtatag	atataatggc	aaaggctttg	agtcaacaca	cttgtggata	12840
attaacatgg	ttccctctcc	aggagagagc	agtcctacga	atgattaaag	gccaggttcc	12900
gagctaagta	acttatctag	atcagtttct	taacatcccg	ttatctaac	taagctttca	12960
ggcaccgtat	aaaagaatct	ggctgtcttc	agccaaatcc	tgttccgaaa	ctgatgtaaa	13020
accttttggc	cttccaagggt	ttgcactctt	ctacattttt	tcccaccacc	ctgactgaac	13080
tcctgcaaat	atgaaagcag	gccagccctg	gtggctcacg	cctgtaatcc	cagcacttcg	13140
ggatgccaa	gtaggcagat	cacttggggt	caggagtctg	agaccagtgg	gaccaacata	13200
ctaaaaatac	aaaattagct	gggtgtgggt	gcaggtgcct	gtaatccag	ctgcttgga	13260
gactgaggtc	taagaatccc	ttgaatccag	gaagtgagg	ttgcagttag	ctgagatccc	13320
acctctgcac	tccagcctgg	gcgactcaaa	aaaaaagaag	ttgaaagcac	tgatctcacc	13380
tcaagaaact	tcacgcacat	aactacaaac	ttgcatagta	ttttaacaga	atcacatttt	13440
tcctggaagc	ctcttgagga	acctccctga	ggaagtacat	aaatcttgta	aataatgact	13500
ctagctgcaa	atagttagct	attcttaatt	ctagattata	cttgaggata	gaggagtctt	13560
ataagttttc	actactagta	gatataattc	atgggtttgg	agtttttaga	attagtcgtt	13620
gattcctctt	tttgttcaca	ttgtcagttg	tgtttaacct	aaggttggtt	ttgaccaagt	13680

tcaacataat	ttttttctag	attcaatfff	tgattgtatc	aatgtacatg	acgactatac	13740
aacatcccta	ccataagatt	gttgaatccc	tcctaattcg	gtgttaactg	ggacagggtta	13800
tttatccctat	taaccocatat	tcgatgatgg	caattgataa	tacaatffff	aaatgatattt	13860
agttatfftg	cttaatagag	tcctatacct	atctggatcc	atffffgatgt	gcttggttgaa	13920
ggcttatttg	tctgagtact	caattaacag	aaaaaagatt	caattttataa	acatttagtag	13980
aaggaatggg	ttacgaaaaag	gatatgaaat	aaattgtggg	gacgcctttg	attacataaag	14040
tacctctaata	gttccaaaaa	agcatgactg	ctagtccctgg	atftaaatta	ggaggcatac	14100
tataatattt	tttccaataa	aataatacagt	cctatttagt	acagctatgt	ctacatcttt	14160
gcactgtttac	caagaaacag	gatatgacag	ttataacttc	atgtacatga	aatgatttgc	14220
aatatctcat	tttccctgac	tgtcatcaaa	gtagtaaaag	agatgaagtc	atfttttagaa	14280
gaatacatatt	aaaaggagtg	tttaatttca	ataatctgtg	ctctaataga	ggagatttgt	14340
atgtctaaat	gtaaggagat	tatccccag	aaaggagggg	gagttggctt	ttatttgagt	14400
tttacaagag	ctctcatggt	gtaggatggg	gatttaatta	tttcaaacaa	caagtattgt	14460
tttagtgaga	cactcttgag	agatggagtc	ctccatgggt	cccttgcat	cataaacaa	14520
ttgctgaata	ggccaagaat	gcaaagcctt	gaccctcctt	tacacagacc	atftctcaag	14580
ggtatgtttg	cagtggagaaa	cctcgagggg	tgaagtaatg	tttccctcct	gtgacaaaa	14640
gtaggcttgc	ttaaagcttg	ttataatacc	gggtggtttcc	caagttcagt	gttccctctc	14700
cctgtaaacac	acaccactgt	atgtaccttt	cactgtatgt	accctctacg	tcttccctat	14760
gggacttggt	cagagaggag	acctgcagca	aacatactgg	ggctcatgct	gcttgctttg	14820
ctgtgactca	ggagtgtttg	tcttctgcca	gcacccatga	aacaggaaca	ggttaactta	14880
ccagctgata	atcaaatctc	agaccaaca	gacacattgg	cctgaaataa	tctcagtaaa	14940
tgaaagtttg	acagtttagg	aagcttatag	aagtcacctt	acatagttaa	tttaaatcga	15000
aggtaagaaa	ctagcttagt	attagtaatt	tttttcagga	tatggaacct	cacatttgca	15060
aattgtggat	gtcactgtag	tctagccttt	tcaagatcac	caaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	15120
agccatatag	taaattggttc	tagaaattat	gaacatatgc	ctgcaggact	aatgaaataa	15180
acagctgtcc	agatattgaa	caaataagta	tgtgtggctt	gggatacagt	ttctagagcc	15240
agaattatac	atggattcag	aaaaattctg	tatttgcaaa	atcttctgtac	agaagtgaaa	15300
atgatatact	gttaggttaga	tgaattttat	tgaagatcat	gtaagaatt	taaatagaaa	15360
atgtgaatgg	gaaaaagcaa	aattttctaga	ttaatatcat	tttatagaat	gtatgattca	15420
taatatgtac	cagttactgt	gtaataaaac	ataattattt	gtagctctta	aagtttctgt	15480
ataaacgaac	ccaaaacatt	ttattttttt	aatgatagaa	attggagatc	acttttatatt	15540
tgtagtatgc	ttatattcag	tcaatatgcc	tctagcctag	gtctctgaca	ggttactttc	15600
ctattttcca	gtttttgtac	tagttttatta	aatttaactga	gtgtcagaaa	tgctttcaaaa	15660
cttctagaat	gtaatgcttc	agacgtaatg	atftttcaatg	atctcttcac	atftcatcact	15720
agtcttttct	ttcttgctct	catcattaca	ctggttaaaga	gaaaaaggct	tatgtaggta	15780
tttgaaatcc	tagaacatag	tgttttttga	tcactgtgtt	atcaattatc	tatgtatgaa	15840
tgtgtctatc	atatatcaaa	tgtaggtatt	actaagaata	acccatgttg	gagtcatagc	15900
cagacttttg	ttagcttcta	gataatacag	ttttgtatft	ttttgttcaa	gattgtctct	15960
accaagtatt	ggggctcaaa	tttatcagtg	ttctcaaaac	aaaaccacaa	tacattgttc	16020
aagttctaga	atftttaatac	ttaaatctat	acttgagggg	attgaaggat	gtttataact	16080
tttattcact	tttaaaattat	taagttgaat	ttttatfttat	atftttgtaat	gtcagtttat	16140
ttgtaaatat	gtattgaatg	cctacagtga	agcaggcaag	atagacttgt	ggatataatg	16200
atgagccaaa	aaaagttaca	gtttctgccc	tcactggcact	tagtggagaa	gccagctgtt	16260
aaagaatgac	actaataaag	ttagaactct	ggtagagcca	ttagagaggc	ctaacaggct	16320
accatacaca	tatgttttagg	aacctggctc	aaacttcatac	gaactaagct	acagtttagct	16380
gctccctggc	tactgtaaac	tgttatctat	ggcataatta	agaatgacag	tgtgaataat	16440
agaaagctgt	agataattta	aaaatcattc	aacttttagtg	ttttgggaaa	gcaggaagaa	16500
tctcacatct	actcagtoat	agttttatag	tcactgtttga	ctgtaacaca	cagtcatatg	16560
tgttaaacat	ttccttactg	tttttgctctg	taactggctc	tgtaatctgt	cctagtgttg	16620
ttacattatt	gtgtgaaacta	attggtaaac	tagttatfttg	tatataagta	aagtgttagt	16680
tggctttttac	actaagaaag	aagtataagt	tatgggggaa	tatttattag	gagataaagg	16740
ataaaaagga	ttcaaagaga	tattaaaatt	gatcctttttt	atgtgtccga	atgtctacta	16800
actttccagt	gctcttattg	tagatttagt	ttttgttaac	agttaaaata	gtttccactg	16860
ttctctgtat	atftttaaaag	taaaataaat	agaatftttaa	agtcgggtgt	ttagaaaaac	16920
cataactaac	gcagttgcct	gcattctgtc	ctgccaaagt	agtcgtctct	tgccctgcaga	16980
taactcattt	gagattgcag	cttccagaaa	tcattgtcttt	aaaacagact	tacagcatct	17040
attgtagtga	aattaaaaata	catgcatcag	ttatcaaaaa	aattfttaag	tattgttaact	17100
cttcaatcat	aacttagctt	tactttatga	aatatgtatg	tttccaagga	gaagtccagg	17160
ggaaagatgt	aaggtaatta	gttctaaagt	gctggatagt	gactcttaat	gactgcagtg	17220
tttttaccac	gttggtatgtt	gatctctgca	gatagttaac	tcttgatttg	tgactgattg	17280
tccaggttgt	gaatttctcc	ctccctacat	tgtcccttta	tcacatcat	catgggttag	17340
taattttttac	tgaagggaag	agagacaagt	cgaatgcctg	gtcagttatg	aacagctgta	17400

gcaaaagatc	tgattatata	ggaagttgaa	aotctagact	gatgagaggc	ttaagaatta	17460
tctgttgata	tttctccatt	tcttattttc	ctttattttc	atggatgatt	aagatgttct	17520
tatagcatta	aattaaagag	ctaaaacatt	atattcttta	gtcttgTTTT	ggaaatttta	17580
tttgaactga	gtaaataatg	taagttttaa	aatttcctga	acttctccaa	agagatctct	17640
aaacaaacac	tcataataga	ttgtgtctagt	agaattgaaa	catgagcggt	ttaatagata	17700
ttggctccta	agtaaacaca	agatgctaatt	agaatttgat	ctttatggat	gatgtttctc	17760
tcaggacttt	gtaattcaga	caccttggtt	gagtcagtgt	tgtttaattgt	tcctctgtgt	17820
atgattgtct	accttggatt	atttattttg	agatattaat	gatcaattct	agctcttctt	17880
tgtgtcacct	gccaccatat	ttctagaaaa	cgcgattaga	tgctttttgt	cattttgtcc	17940
cagataaaa	tcttacttta	aaaaaatact	ataaagggtat	tatggaaatt	atgccttttg	18000
agtgtcagat	agtcactccg	tttacaattt	aatagcaaac	atagtagtat	ataattagaa	18060
tatactttta	ttattttttac	agttttttacc	cacctcttga	tgaaccatct	attggaagta	18120
aaaatgttga	tctgtcagga	cggcaggaaa	gaaatcttca	aagggaaaaac	atztatattt	18180
ttgaatgcca	aacaggtaat	tatgttataa	gctaaatttt	cctaaagaat	acattacaaa	18240
ctaggatata	ttatcagtag	ttgttaacgt	tatgttaacgt	atttcatttt	ggggttttgt	18300
gtaaaagtgt	gaagtagaat	aaaaaaaccc	caggcaccag	acctgcccag	tgatcatggc	18360
tgtgattacg	gggtttctta	aaatctgtga	taactggcct	atcataaaat	atgcaagtga	18420
gaaggacagg	aaacttagtt	ttaacttctt	tagttagtaa	gctaaacctc	tttagtttag	18480
aagctcacta	aagaagttta	atcagttgaa	tgtttctgt	gtaccaaaagt	ggggtttcca	18540
agagtttatg	ttgtagtggg	gaaatgcaga	taagcccaaca	gttagagtgc	tgtaggaag	18600
tgtgatgagg	aaccacagag	agtgtaacag	ttccagggcc	gcagagacct	gttgaactag	18660
ggactttctc	aaagtggaa	ctgaaatgac	ctactcaaga	agtagacca	agtcttcttg	18720
aatgttactc	tatgttttcc	caaatcaaat	tatgttgtgt	tcaaaaaaatt	actacatttt	18780
actttaaaaa	atgtttcctt	ccatttttag	cataagaaat	tgagttccgc	agttgtcttt	18840
ggaggtgggg	aagctagggt	gataacagaa	gagaatgaag	aagaacataa	tttctttttg	18900
gtccggggaa	cgtgtgttgt	tgatacagga	ataacaaact	cacagacctt	aattcctgac	18960
tgtcagaaga	aatggattca	gtcaataatg	gatatgctcc	aaaggatatag	aattattctt	19020
tatttagtaaa	aaactgcaag	taggagattt	tgggtttaac	cttttttgtt	gcttttccac	19080
taacaatgta	aaagtagata	caagaatttt	ttttttttga	gacggagtct	tgctcttgtt	19140
gcccaggctg	gagtgcagtg	gcaogatctc	ggctcactgc	aacttctgcc	ttctgggttc	19200
aagcaattct	cctgccttag	tctcctgagt	agctgcgatt	ataggcacc	accaccacac	19260
ccagctaatt	tttgcacttt	tagtagagac	aggggtttgc	catgtaggcc	aggtctgtct	19320
tgaactcctg	acctcaggtg	atcctcctgc	ctcagctctc	caaagtgtctg	ggattacagg	19380
catgagccac	cgtgcctggc	ctatttttta	tttttttgag	acagggtctt	gctctgttgt	19440
ccaggctgga	gtgcagtggt	acaatcttag	ctcactgcaa	cctctgcctt	ctgggttcaa	19500
acgatcctct	gctcagcca	ctctagtagc	ggtgtgacac	gggtgtgacc	accacaccca	19560
gctaattttt	gtattttttag	tagagatggg	gtttcaacat	gttggccagc	ctgggtctca	19620
actcccatcc	tgagatgatc	cacccacctc	ggcctcccaa	agtgtctggg	ttacaggcgt	19680
gagctactgc	gcccggccga	tacaagaatt	aataaaaagg	tttatagtgt	agtatacttg	19740
aaaattaaatt	gtgacttggt	atattagata	tagaatatct	ttattcatga	cagttttact	19800
caaaaatatt	ttatgctttt	ttgttacttt	aatagaattt	gtagaatttt	cctctgtaaa	19860
ttaacaaagt	agtgttaagt	ttttttacag	aatatgttgc	atttgagaaa	cttaaaaact	19920
aacggtaaaa	ggttttctgc	aattgcctag	cgttgaaatg	tatttgcctt	ttgatggtta	19980
ttacccattt	gaaagacata	taaacattcc	tatccttata	taggctatta	tgggaaagca	20040
gacaaaaagt	cagatagggt	gaaatgatgt	ttgttagagt	gagggagact	gtaaaagagc	20100
taactgaagg	atttttctta	gactttaatt	tgcatttaata	atcttagcat	tggtgaagcc	20160
agtaagtatt	gtagaaatat	atggcttggc	agtcttctga	ctaaattgct	cttcatgtgg	20220
caaaaagtag	gtgaggacta	aagtgtttat	atgocctgaa	agtccacagc	cagcttctta	20280
ccaaagattc	atcttctcctg	tcccaggagt	ccttctgacc	atggggggat	tttctttttt	20340
tctcttacag	gcttgctgaa	ataaaaagta	aaatttttag	catctatcct	ataaatattt	20400
tacttaattg	agatatatta	actactgtaa	aaaagaagat	atactatata	acaaaaatac	20460
tatcttatta	ctacaacaca	aatttactgt	agttccattg	tgtttttaggc	actggaaata	20520
taatgaaaaa	caagatagtc	acagtccttg	ccatcactgg	agcttactgt	ctagaggcag	20580
agacagagaa	agacaagtaa	acaaatcatt	acacatgtat	ataaagggaag	cagtaacccg	20640
gcagtggggg	agaagcttat	tctaaccaga	gaaggcctct	tttaggcaat	gtcttaccta	20700
tgaccagttt	ttcaaagagc	cagacaaaga	atgtgccaa	cagagcaaca	gcagtaatac	20760
attaaaaaaa	aaattatcct	acatagcagg	ttctgtgcta	agaatttatg	tatgtataaa	20820
catttaattc	tcaacctata	tattattttac	tggtgtgggc	ctcactgtgc	agatgaggga	20880
actgaggcag	aaggggggtt	gcataatagca	gaggcagtga	gcagggtggc	caggatgtga	20940
gcccaggcag	ttggattctg	gagtcacagg	tctttacttt	cagcacatat	tgacaccttg	21000
aggttaaaaa	aaagtagctg	gagtagcagg	cctgggtgct	cctgggtgct	tgatcatgag	21060
gtgacacttg	gcccctgtta	caatatgtgt	ttttgggttt	ttgggtgggg	gatgttgaga	21120

catgggtttca	ctccaggctg	gagtgcaatg	gtgtgatctt	ggctcactgc	agcctccact	21180
tcccaggctc	aagcaattct	cctgcctcag	cctcccaagt	agctgggact	acaggcgtag	21240
accaccacgt	tgctgcta	ttctttat	cttbttagaga	ctgggttttg	ccatgttgcc	21300
caggctggtc	ttgaactcct	gagctgaagt	gatctgcctg	cctcagcctc	ccaaagtgt	21360
ggcatcatag	gtgtgagcca	ccacacotgg	ccacaatatg	ttttttggag	ggaatgcagt	21420
attatatttt	gagaaagact	gtcacttaaa	atgatacctg	ttaaacttagt	tcaagccaat	21480
gaaggagcaa	ttatatgaag	cagagtggcc	agtaaaagcca	gctattgacc	gaacttcaac	21540
agggcaacat	tgtgattggg	gattgccaatg	gctgtattga	ttagatgtca	gaagtgaagta	21600
taggaaatct	gtggtaaga	ttaaagtgtct	tttgagagaag	attagaagtc	taggggaaca	21660
atacagccct	gattttttgtt	cttgctgaga	cctttttccg	gtatctcagc	tcaaattttg	21720
taactcttcc	tgttattaat	ttaatatttt	tctctttatt	tctcctgtct	tttcttctct	21780
tctgacctg	ttccccagcc	ttgcacagaa	ttggatgaat	cataatcctt	gggtccatgac	21840
acatgctcat	callgatcta	tgctaatatc	acattttattt	tggtcaccaa	ttattttagtt	21900
atttttcaga	cagcaagtgt	ttgaaaaaat	ctgtcatcta	aaataaccagc	cagatctttg	21960
aaaataactt	acgtgggttac	ccctagccca	gttttctcct	gtgtgaaata	actgtcatcc	22020
agaatccagt	ttacagtgtg	gggtggccag	agcctattca	gcagtccagg	gtgcaagggtg	22080
ggaaccaacc	ttggtagga	cactattcca	ttgcaggcca	cactgacaca	cccacccaca	22140
ctcactcaga	ctggtagcaat	ttggacacac	cagttcacct	aatgtgcaca	tcttttggaa	22200
gaggtagtaa	agcagagtac	acacagaaaa	cccacacgga	cactggggga	gagtgcacaa	22260
tccacacaga	cagcggccct	ggtaggaat	cagttttttc	ttgcgatgt	cataatgaaa	22320
tgacactgaa	tgaatgatg	ttattcgagg	acctgctata	tagtaaaaaat	cttttctgtct	22380
ttagtcatg	ctaaagatac	tcacctatgt	tttttactag	tatttttgata	ccatcttttg	22440
tttttgacat	ttgtttttaa	cttatctgga	attctgtttt	ataccaaaagt	tacatgcact	22500
tttgtgtttt	tgacttttatt	ctttttcatt	catcagtcctg	cctttctttg	taccaataacc	22560
acattgtctt	aattagtata	acttccatga	agtcctccta	gctggtagaa	caagtctttt	22620
tttgtctctt	ttcggaagca	tctggctat	tcttggccct	ttattttttc	attttacattt	22680
agaatcatct	tttgttaaa	tttgtttgga	ttttgattag	gaagtgcatt	gaatctacaa	22740
ggcaacttga	gaattaacga	tttatgtaaa	ttttaattgt	ttttatcctt	gaatgtggta	22800
tccccattta	tttaggtttg	cttgaaatct	cttaatagaa	tttttatattt	tctgtagaga	22860
gatcttgaat	atcttactgt	atttattcct	agctagtaca	tattctctga	tattattata	22920
aatgaatgat	attgtcactt	aaattacctt	ttctagtcca	ctactgctgt	aaagaaattc	22980
agctgacatt	cagataatca	tcttataatc	agccatcttg	ccagactcct	cttttttctt	23040
aataatttat	ctatagtctt	ttctataaat	cattatcctc	tataaggaat	gtttccattc	23100
tcctttgtaa	tcgttatttc	tctgatacct	cttttttctg	tctctttgtt	ccataccaac	23160
tgggacctcc	agagcagtgt	tgaacagaag	tggtgaaaat	ggccacattt	atctcactgt	23220
tgactttaaa	ataaatgctt	ccagtgttcc	ttccattagg	gtgatgtaat	ttctgtagag	23280
cattattaaa	tatgtattaa	aaatgtttct	attttatgta	accattcttt	ataactaatt	23340
cacatagtat	aagttatagt	tgcaaaaagt	agtaaaataa	ataccagttt	tgaattacct	23400
aaattacagg	taggtatatg	tgatcacttg	attataaagg	tttttttagat	tttatttttt	23460
tagtctgata	tttaattgc	acgtataact	gaatcctatt	taagtaagct	cagtaacac	23520
aaaaagacac	attaagcatt	tcaaaaagac	cttacgaact	aaccatttaa	aatatcttga	23580
ctgagcaagg	tggttcacgc	ctgtaatccc	agcacttttg	gaggccgagg	aggggtggatc	23640
acttgaggcc	aggagtctga	taccagcctg	gccagcgtag	tgaaacccca	tctctactaa	23700
aaatacaaaa	attagctggg	tgtgttggtg	cgcgcctgtg	gttccagcta	cttgggaagc	23760
tcagggcaca	agaattgcct	gaacctggga	ggcagagggt	gcagtgaagc	atggttgac	23820
cactgctctc	cagcctgggt	gaaagagcaa	gtctctgtct	cagaaaaaaa	aaaaaaaaatc	23880
tttacaatga	gtattgaaga	cattttgtag	ttgtttgtta	aaatttgagg	tgtaattttt	23940
atatgatatt	aaatgggtga	ttttttgttt	tataaaatca	gtcattgacc	ttacagaaca	24000
acaaaaata	gggtcaccat	aagattcctt	taatgtgaag	atacctaat	acttgtaaat	24060
ttggcaaaat	gatttgattt	actaaaagtt	gtaacacatg	tatagatata	ccttaggtat	24120
agttctgtct	acttctctcc	gtccttctcc	tctctctctc	ttttttcttc	tctttgaagt	24180
ttcatcttag	gtcatagta	tccgtagatt	tgtttgtaaa	agcctgtggg	gatttttttt	24240
aattcttttt	ttttgagacg	gagtcctcct	ttgtcatcca	ggctggagtg	cagtggcgcg	24300
atctcagctt	actgcacact	ccacctcata	agttcaggcg	attctcttgc	ctcagccttt	24360
tgagttagcta	ggattacaag	cgtgcaccac	tacacccagc	taatttttgt	attttttagta	24420
gagatgaggt	tttaccatgt	tgccagggct	ggtctcaaac	tcttgacctc	aagtgatcca	24480
cgcgcctcag	cctcccaaag	tgtgtgggatt	acaggcatga	accacccatgc	ctggccataa	24540
aagcctgttc	tggtgtttta	tttgggtagt	actgtattct	ttttattcca	aaaattgtag	24600
aattttagaa	ctgggaagat	ctatatctct	tagcccttta	ttttacagat	gaagttaaatg	24660
gagttactaa	aagatggtag	acttgtcaac	gtaacagtg	ccagcgaggt	aagctattat	24720
agtactctgc	atttgaaatt	ctgtctatac	cataaaatta	tttgggagga	aaaaaaagag	24780
gttgctttat	cttgacatta	tctgaataaa	agttgctagt	tttaatatat	tatcatactt	24840

aaactat	ttt	attc	taata	g	caagg	t	ctt	agac	ct	at	ctga	agc	a	attg	g	attg	24900
gcgg	tg	att	tc	atg	act	ac	aa	ga	at	ta	tg	at	cc	tc	ag	ta	24960
aatt	ga	ag	ca	tt	at	tt	tt	tt	tt	tt	at	gt	aa	at	cg	ata	25020
tata	cg	tt	ac	tt	ta	ct	tt	g	g	tt	cc	at	gt	tt	ta	aa	25080
attt	ata	ct	tt	ta	ct	tt	tt	ta	aa	tt	tt	gt	gg	tc	ag	ta	25140
tat	ga	ag	tg	gg	ta	aa	ta	aa	at	aa	tt	aa	at	aa	at	aa	25200
tca	ag	att	ta	gt	aa	ag	ag	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	25260
cagg	ta	aa	ac	ag	gt	gt	at	gt	aa	at	gt	gg	ct	at	tt	ag	25320
aagg	aa	ag	tc	ag	gg	gg	ac	at	tt	g	ag	tc	gc	at	gg	gc	25380
tgt	tg	ag	ga	tt	gg	gg	gg	ta	at	tc	ag	gt	ag	gg	gg	gg	25440
gtg	gg	ag	aa	tt	ct	aa	gg	gt	gt	aa	ag	gg	ag	gg	gg	gg	25500
aaat	ct	gg	at	gt	aa	ag	ag	ct	gt	gc	tt	gg	ac	gc	at	gc	25560
aaa	at	ga	ac	gg	tt	ca	gg	at	at	tt	tt	ta	ga	ac	tc	gg	25620
ag	tt	ag	aa	ac	aa	ct	ct	ag	tt	ct	ag	at	aa	ct	gg	gg	25680
ctg	ag	at	g	aa	gt	gc	at	ta	aa	ta	tc	ag	tt	gt	ta	aa	25740
ag	ag	ac	ag	tc	act	gt	tt	ccc	ttt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	25800
ttt	tt	ag	ta	ag	tt	gt	tt	gt	ta	aa	at	gt	tt	gt	tt	gt	25860
ag	at	tt	tt	tt	ac	at	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	25920
cc	at	tt	ct	gt	ta	tt	cc	tt	at	at	tt	tt	tt	tt	tt	tt	25980
ag	ca	gc	at	tt	gg	gc	ta	aa	ag	ag	ac	ag	ac	ta	ca	gc	26040
act	cc	gg	gg	ga	ct	ca	tt	cc	at	gg	gc	at	ta	gg	ag	tc	26100
at	ct	ct	gt	ag	tg	ct	ct	g	ca	aa	ag	ta	ag	ga	at	gt	26160
tg	ga	ag	gg	ag	ta	gc	ca	tt	ac	gg	cc	ta	at	ga	cc	ag	26220
gt	aa	cc	at	gc	at	ag	ta	aa	ta	aa	ta	aa	ta	aa	ta	aa	26280
ct	tt	ac	ca	tc	aa	ct	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	26340
ca	tt	ct	act	tt	tc	gt	ag	at	ga	ta	gg	aa	ct	g	ac	gc	26400
tag	ca	ag	ta	aa	tt	gg	tt	ca	ag	ct	g	at	ct	ta	aa	ag	26460
at	gg	ct	ta	ta	tt	ta	at	gt	gt	gt	ag	aa	at	gg	gt	gt	26520
tg	at	g	ca	aa	aa	gc	at	ag	ac	at	tt	gg	gt	gt	gt	gt	26580
aga	at	gt	tt	ta	tt	ca	gt	g	ac	at	tt	gg	gt	gt	gt	gt	26640
g	ct	gt	ac	at	gg	ta	ac	ct	tt	tt	tt	gg	gt	gt	gt	gt	26700
ta	ac	ca	aa	at	ct	tt	at	tt	tt	tt	tt	gg	gt	gt	gt	gt	26760
ga	at	tc	at	cc	at	aa	ag	ta	aa	aa	ag	ta	aa	aa	ag	ta	26820
tt	tt	aa	at	gt	gg	at	gc	ca	aa	aa	ag	ta	aa	aa	ag	ta	26880
ct	ag	aa	at	at	gt	ca	aa	ct	tt	tt	tt	gg	gt	gt	gt	gt	26940
tt	ct	gt	tt	ct	ct	ta	ca	g	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	27000
ac	at	ata	aaaa	ac	gg	gt	g	at	ta	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	27060
gg	gt	ca	ct	gt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	gg	gt	gt	gt	gt	27120
ga	aa	ca	aa	tt	ct	ta	ca	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	27180
tag	ac	at	ct	gt	ag	tt	tt	tt	tt	tt	tt	gg	gt	gt	gt	gt	27240
act	ct	ag	aa	aa	cc	act	aa	at	tt	tt	tt	gg	gt	gt	gt	gt	27300
tt	tt	ata	ta	aa	aa	ga	ag	ag	ag	ag	ag	ag	ag	ag	ag	ag	27360
tt	cc	at	tt	tt	ta	cc	aa	ag	ac	ac	ac	ag	ac	ac	ac	ac	27420
g	act	gt	cccc	tt	ct	ca	ag	ac	ac	ac	ac	ag	ac	ac	ac	ac	27480
tg	ct	gg	tt	gt	att	ag	ta	at	tt	tt	tt	gg	gt	gt	gt	gt	27540
ta	at	at	tt	ta	ct	at	g	cc	act	at	tt	ca	at	tt	ca	at	27600
ct	t	at	tt	at	cc	ac	ga	at	ta	aa	aa	aa	aa	aa	aa	aa	27660
tt	ag	ct	g	ca	g	ct	cc	ct	cc	ct	cc	ct	cc	ct	cc	ct	27720
gt	gt	g	cc	ata	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	27780
aga	at	gt	tt	ca	gt	act	g	ct	g	ct	g	ct	g	ct	g	ct	27840
a	agg	ct	ct	tc	ta	aa	tt	gt	tt	tt	tt	gg	gt	gt	gt	gt	27900
t	ct	at	gt	ct	ca	gt	ag	ct	tt	tt	tt	gg	gt	gt	gt	gt	27960
ag	tt	gt	tt	tc	ac	ac	ct	ct	ct	ct	ct	gg	gt	gt	gt	gt	28020
ccc	ct	aa	ca	g	ag	ca	ag	ca	ac	ac	ac	ag	ca	ac	ac	ac	28080
aa	ct	aa	g	ct	ta	ca	ca	ca	ca	ca	ca	ag	ca	ca	ca	ca	28140
cc	act	gt	tt	ga	aa	tt	gt	gt	tt	tt	tt	gg	gt	gt	gt	gt	28200
aaa	ag	ata	ag	gt	ata	cc	aa	gg	gt	gt	gt	gg	gt	gt	gt	gt	28260
cc	ag	tt	ct	ta	aa	tt	gt	gt	tt	tt	tt	gg	gt	gt	gt	gt	28320
cc	t	ac	ag	aa	aa	ag	tc	at	g	ac	ag	aa	aa	aa	aa	aa	28380
tg	ca	at	tt	tt	ct	g	ta	gg	ta	gg	gg	gg	gg	gg	gg	gg	28440
aa	tt	tt	ta	ta	g	ac	ac	ca	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	ac	28500
cc	tt	ct	ct	tt	gt	tt	tt	tt	tt	tt	tt	gg	gt	gt	gt	gt	28560

tatatccctg	tattatggca	agcacttgaa	ataaagaggt	gaatagatga	gaccaagttc	28620
ctgcccttat	ggatattttta	acaaggagaa	aattgtaagt	aatctgttaa	caaacaccag	28680
ttatttttggg	ccattagcctt	attattattta	ttattattt	ataaagtott	gctctgtcac	28740
ccaggctgga	gtacagtggc	atgatcataa	ctcacgcagc	cttgaactcc	toggcccaag	28800
caatcctcct	gcctcacccct	cctgagtagc	tgggactata	gggtgtgcacc	accatgccc	28860
gctaattttt	aaattttttt	gttgagatga	agtctcaacta	tgttgaccag	gttggtctct	28920
taactcctgg	cctcaagcag	tcctccttgc	tcctcctccc	aaagtgcctga	gcagcagcga	28980
gccacctcac	cgagcctaca	ttaaattatt	cagtgtgat	atgaacattt	ataattttta	29040
ctctttccaa	acttatgtgc	agctgaaaat	gaattctaga	gatattgtgc	ttaaaggaaa	29100
tggcagttag	cttctagagg	tcacatagag	aaagtggcgg	aagtcattta	aatatctgaa	29160
tttagaatta	gtagtaata	ttaaagacat	cctgtgtcac	aaggacctag	cagaatgata	29220
atttagctta	ggtgttttagt	aaatatcaac	ttaaaatttt	tttcagttaa	tagtgtaaac	29280
ttttttttaca	tctactctat	accaaataatt	gctctaggta	ctgggtgatac	agaaatacac	29340
aagacttagt	ccttattctc	aaggatacac	cagtctaaca	agggaaagta	gcaagtaaac	29400
aagtgtgat	aatgataaca	gctaattgctg	gcacagtgtc	tactatgttc	caagcatttt	29460
tcagggggct	attttaccct	ccaaacaact	ttgtgaggca	gatgttataa	ttatttctat	29520
tttatagatg	aggaaaggga	agcatagaga	agttaaataa	cttgacacag	gtcactcagc	29580
tagtcataag	tgaattttgt	ttattgtctt	tttgtgtgtg	ttttttgaga	taggggtctta	29640
ggctggagtg	ccatggcaca	atcactgtct	actgcagcct	tgacctcctg	ggctcaagtg	29700
atcctcccaac	tttagcctcc	tgagttagctt	ggagtgcagg	tgtgtgccac	catgcctggc	29760
aagttttttt	taattttttgt	agagatgggg	tcctccagtg	ttgcccaggc	tgggctcaaa	29820
ctcctgggct	caagtgtatcc	tcctgcctca	gccttccaaa	gtgctgggat	aacaggcgtg	29880
aacctgtgca	cctggccttga	attgttatta	gaatgatttg	cgtggtggta	tggaaaggaga	29940
attggagagc	acttaattca	gtgtgggaga	ttcaaaaaaa	gtattccaga	agagcagcac	30000
ttgaactaag	ttgttcttct	ggtaagttaa	aagatgaggt	aatcattatg	gttttctgga	30060
gtagccagaa	gtttatgtct	aagatgggtt	tacatgattt	gtttcaataa	atgtattcct	30120
tatgaaaata	aaactcacta	attctgattt	ctatagatgg	taggggtgtat	acactttctg	30180
tgggggaata	aatgtaattt	tttggcccac	tgacttaaaa	cataatttga	attagaattt	30240
gcttattttta	tttttcttct	agttgataag	acttcagcac	aaagtatctg	atgtggcttt	30300
aaaatgattt	ggtttagata	agccctcat	agatgccgcg	aggctgttta	tagactgttt	30360
tgtgtttgtt	ggtaccactc	attggagaaa	accatgtgca	gtattcccta	gttaatcccc	30420
tcagcatggt	atagtctaac	aatttttaagt	gaccagatgt	tcctcttcta	tctagcagtt	30480
gtgattcttt	ctttctactt	gtgtgattta	caggattaaa	gacaacaact	ccaggacca	30540
gcctttcaca	aggcgtgtca	gttgatgaaa	aactaatgcc	aagcgcccca	gtgaacacta	30600
caacatacgt	agctgacaca	gaatcagagc	aagcagatac	atggtaaagc	ttcttcatta	30660
ccgtactatt	gttattatct	tatcaataaa	ttaatagtat	attcagggaag	taatgccctt	30720
tatcaggttg	tctcttgaga	gagaaagcat	ggaagaatgg	gataccaggg	aaaatgatat	30780
cttaggacaa	gggtcagcag	gttttctgta	aaggagcggc	gagtagttat	tttcggcttt	30840
gaagactgtt	gatctctgtc	ccagctcctc	cactctgcca	ctgtagcatg	aaagtggcca	30900
tagacgatat	gtagtcatgt	tcaagagaca	atcgttagtc	tcttaagac	aaggatactt	30960
tccaaagaaat	gcttccttac	acaatttttg	catttgtgtga	acatcgaaca	gtgtgttgac	31020
ataaaacctac	atggtatagc	gtactgtata	gtatagatag	cccaggggtt	ccttatctct	31080
cagccacggt	atcagtcctat	cacctgttag	gaaccaggcc	acacagcagt	aggtgatcag	31140
cgggcaagct	agcaaagctt	catctttatt	tgcagctgct	cccattgctt	gcattaccgc	31200
ctgagctcca	cctcctgtca	gatcagcggg	agcattagat	tctcatagga	gcacaaaccc	31260
tattgtgagc	tgtgcatgtg	agggatctag	gttcttatga	taatctaattg	cctgatgatc	31320
tgtcactgtc	tcccatcacc	ctcagatggg	actgactagt	tgcaggaaaa	cgagcttaag	31380
gctctcactg	attctacatt	atggtgagtt	gtataatttt	ttcattatat	attacaacgt	31440
aataataata	gaaataaagt	acataataaa	tatgcttgaa	ttatccaaaa	ccattccccc	31500
ctctgccgcg	aaacctggaa	cctcaccacg	aagctggctc	tgggtgcca	aaaggatggg	31560
aactgctggt	atagactatt	tctcctaggc	tacacactta	tatggcatgt	tactgtactg	31620
atactgtagg	caattgtaac	acaatgggaa	gtatttgtgt	atctaacaat	agaaaaggta	31680
cagaaaaaat	attgtataaa	agataaaaaa	tggatatcct	gtataagaca	cttaccgtga	31740
atggagcttg	taggactgga	agctgttctg	ggtaagtcaa	tgagttagtg	gtaagtgaat	31800
gtgaaagcct	aggacattac	tgtacatgat	tgtgacctta	ttagcactac	atttagacta	31860
cactaaattt	atatgcaaaa	aaatcttcaa	taataaatta	accttagctt	actgtaactt	31920
ttgtactctg	taaaacttta	taatacctag	cttaaaacat	ttaaaacatt	gtatagctgt	31980
gcaaaaatat	tttcttcata	ttattcgata	aggttttctg	ttttcaaat	tttaaatttt	32040
gttttacttt	ttaaaotttt	gttaaaaaa	aagacataaa	catacatggt	agcctaggcc	32100
tgcacagagt	taggatcacc	gcagtcattg	ccacatcctg	tccactggga	aagtcctctg	32160
gggcactaac	acacatggag	ctgtcatctc	ctatgataat	aatgtcatct	tctggaatcc	32220
ctcctgaagg	gactgcttga	gactgtttta	aagttatttt	ttttataaga	aggagtacat	32280

tctaatagata	aaaagtataa	tatatagtaaat	acattaaccca	gtaacatag	cattttattat	32340
cattatcaag	tattatgtat	tgtaccgaat	tgtatgtgct	ggtgtgctat	actttttatac	32400
aattggcagc	ataggtttgt	ttacatcaac	atcaccatag	acacttaata	ggttgactcg	32460
tgctgtcaat	agggtatagc	aatttttcag	ctcctttata	atccttatggg	accagcatca	32520
tatgttgcag	tccattgttg	acagaaatat	cattatatag	tgtctgtgac	tgttaattgaa	32580
agtgttgtgt	tctaataaact	gtgttttataa	aaataagtg	cagatcagat	ttggcctaca	32640
ggctgtagtt	tggcaactcc	tgtcttagga	tagttttttt	attccttgca	aatgtacatg	32700
gatgactgga	aagaattgtt	caacttat	gtaactgggtg	agataagttt	gaaatacata	32760
tatttgtatt	gcgtgatgtt	gcctatat	gaatgttact	tgttaattttg	aagatacttt	32820
atatgtgtct	acctagctat	ttaaatagtt	aatagttgtc	cataaagata	gtttttctat	32880
ggttctttat	ctgaagagg	attttgtttt	gttttgtttt	taatggaagg	ggttagcact	32940
tttatattat	ttgttatttt	ctatttaca	ccgtatgttt	tttattttta	atatgacata	33000
atgaagtgtt	catttaaga	tacttaagat	atcactgtat	taaacccttat	ttattttaat	33060
ttttgctaca	ctcatattga	ggccagattt	aactttttca	agagaaattg	ttaagggtttt	33120
ggaagtgtct	tgaatgacag	cctgacctct	tggttttgtt	tttttttttt	ctgtaaaaata	33180
agaatagcaa	aggcagtgct	taatttaacc	atactttgta	aaagtaaaaa	gtatataaaa	33240
gtatactctg	tgcattgtatg	ttgaaaatat	ttttctggta	atctaaagtt	ctgttctatt	33300
ctcgagtctg	ccatctgggt	gaaataatga	tatcagttca	tttacagtga	cctgaatatc	33360
ttatatgtga	ttttattctg	attttccatt	tttaataaaa	agggtactata	ataatataat	33420
aataaataat	aatgaaagta	ccataatagt	gattttacgt	gggaataaatt	taaaaattttt	33480
aaacaaaaca	gaaattgcct	aggattatca	cctagtttaa	cttataatag	gctatgctaa	33540
gttggattct	tgtgtgtgtt	tgtcagtgct	ctatagtgga	gcaacaatat	gtgctgtagg	33600
gggtgaagaa	gagtaaggta	tcctctctcc	acaggatgct	taggtaataa	aggagttgct	33660
ttcttgggat	ggtaaaaatat	attcagtgta	tttttgtcta	aaaattatct	tctaagggtta	33720
tattacgtta	gaactatttt	acgatctttg	tttctctatt	aaagttgctg	taaacttgat	33780
tatttacctt	gcattctttt	ctttttctac	agggatttga	gtgaaaggcc	aaaagaaatc	33840
aaagtctcca	aaatggaaaca	aaaattcaga	atgctttcac	aagatgcacc	cactgtaaa	33900
gagtcctgca	aaacaagctc	taataataat	agtatgggtat	caaatacttt	ggctaagatg	33960
agaatcccaa	actatcagct	ttcaccaact	aaattgcca	gtataaataa	aagtaaaagt	34020
agggtctctc	agcagcagca	gaccaactcc	atcagaaact	acttttcagcc	gtctacccaa	34080
aaaaggctctg	tttttgataa	cttctctcat	gtctctgaaa	aaaaaatgaa	agttttttat	34140
actgttgtag	aatgggtattg	tcttttagct	gttctgatta	agtatgcttc	tgtgtgtgca	34200
gctttttgac	cgctttccct	ctcagaaatg	tccttgatct	ccttcactag	agccactaga	34260
cagtttctcc	ttcatctcct	tctatgtatg	tacttacgtg	ttattttact	tgcgcgaatt	34320
ctctcaata	agaactaacc	ccctgtctca	gctctaaaat	cacatttctg	ctggttttcc	34380
ttgagaacccg	ctctcactcc	ctcaggacc	atattccatc	aattattttc	tcaattttca	34440
tattttgaat	atattgatca	tcccagattt	ttttcttctg	ttttcaaaag	ttcaatctca	34500
cctttatttt	tgaaaacctt	ctcttgacct	ggtttcttcc	tctagctact	gctgcctttt	34560
ttcttgtgco	gtcccgttaa	gcttctcaga	aaagatgatg	ttattttctcc	catttctgta	34620
tgaactttgg	aggactctct	ttcttccctg	tactgtctct	tatactctac	cttcagggtt	34680
tgagacttta	ttaactgaaa	tcaacatag	tggccctaac	ttttctttta	aactttactt	34740
cttttccaca	gggggtttcat	gctgtttccc	cagtaataga	cctaaaaact	ttttctgtcc	34800
tctocacaaa	tgtgggttttg	tttttttttt	ttagtaaaaat	agcttatggt	gttacaattt	34860
ttgactcttg	tctctgggt	cctgaaatca	gtgttattga	ttgttatttt	cagtgtctgt	34920
caatccctcc	atttccatct	attgcccagg	tcaaaactctg	accacctaaa	ttattacaaa	34980
aacctctcga	ttgggtgggt	tgtccagtac	cttggcatta	aattagtgtt	aatagaacat	35040
tgggttgact	gttcttgttc	aacatgaatc	caataaactc	ctggagaaca	gagtcocagg	35100
tctttgtgtc	ctctatgggc	ttagtacagt	ttgcataaag	tgtttgggtat	ttattgaatg	35160
aatgatacag	tattgtatag	gaaactttta	gtgatataat	cacatagcat	ttgcagtata	35220
cagtcagtac	cgtattgtag	atttagtcac	ctgacttac	tgtcttgaat	ccatctctca	35280
ttaaaccatc	agattgtatt	cccagggcag	ttttccctgc	ccacaacctt	actacgttat	35340
aaagtaagtt	gctgtctctt	ggcaacagtt	tctttgtatt	tttatatttt	tctacctttt	35400
cctgtaattt	tccaactaat	gcaacttaag	cagagaagat	agagatcacc	gtactgcttt	35460
agccacaggg	atccctagtt	ctatcaaaac	agcagaatgt	atgtgagttc	tgcactgttt	35520
tcaaagggtct	atltgttgat	ttccagtaat	attgttaata	aaatcaagag	tacattgtga	35580
actaaatgga	gggagtgtatg	aatattgcca	aactaaatgg	ttacttagct	gtgttcattt	35640
tcttgttttg	ttttcttctt	ttttttttaa	tctaagggaa	agggatgaag	aaaatcaaga	35700
aatgtcttca	tggcaaatcag	caagaataga	aacgtcttgt	tctcttttag	aacaaacaca	35760
acctgtaca	coctcattgt	ggaaaaataa	ggagcagcat	ctatctgaga	atgagcctgt	35820
ggacacaaac	tcagacaata	acttatttac	agatacagat	ttaaaaatcta	ttgtgaaaaa	35880
ttctgccaagt	aaatctcatg	ctgcagaaaa	gctaagatca	aataaaaaaa	gggaaatgga	35940
tgatgtggcc	atagaagatg	aagtattgga	acagttattc	aaggacacaa	aaccagagtt	36000

agaaattgat	gtgaaagtgc	aaaaacagga	ggaagatgtc	aatgttagaa	aaaggccaag	36060
gatggatata	gaaacaaatg	acacttttcag	tgatgaagca	gtaccagaaa	gtagcaaaat	36120
atctgtaagt	aacatttttaa	atgagaggtg	tagtacatag	aagccttagaa	tgctaacagg	36180
tactttcgat	tttgtattga	cagtatgagc	atccattaat	gtcttttaaca	ctcagtacta	36240
tagaaatttg	ttgggttgata	aggtaaatgg	taaatgttaa	aagtacagtg	attcttcagt	36300
agtgtaaaat	aaatgaccac	aaattaaact	ttcatatgag	attgttttac	tagattttcca	36360
aattaggctg	tactattata	aaagacattt	ggctatgatg	ataagtgtag	gagatgcttc	36420
agtataagaa	acaggcacag	aaagatgaag	ttagtaaaac	aaagtatcta	ctcaataaat	36480
tttttaggata	taacatcact	aggaattttc	attttcattt	agggttttga	atgtccttgt	36540
ctattttcat	gactgttgat	aattttgtct	acccactttg	atctatgaaa	acacctgaga	36600
ttattttctt	ttttgtatag	atcagtaagt	tgacttatct	gtagatttgt	tagctcttta	36660
gatgagagca	cagacctgat	gaagtaaaac	tttaatatct	tgatctccaa	tggtgattca	36720
ttagctocac	tcattcatgg	ctgtgggtcat	cctctccagt	aacacctgca	gaataaggac	36780
aggaataggc	gaaaggatag	gattaagtga	acggaagtta	tagttttatta	gctaagcagt	36840
tgagaacctc	gtgtgtatca	aggaccttat	aaatctacaa	ctactattca	aaaaacagaa	36900
cctatgtcct	atttggcctg	tgtattgtta	ctttcatata	ggcaaggga	tccccattat	36960
ttgttacttc	ttctgagtga	tcctaaatgc	ccttctgtgg	accagctgca	ttggagtcag	37020
ctggtaagct	tttctaaaat	atagattccc	aggccagagc	cccagagatt	ttcattcagt	37080
atatctgatt	ttccttccca	ggataagtgc	cctcattggg	ttagctaaga	attcctttga	37140
tattttttaa	aattctaaaa	tcagtggctt	cgtaaaaata	ggatcttttt	tccccataa	37200
aagtgtcctg	gaagttagata	atcagagctg	cttcccattg	tattaattta	ctagggtctt	37260
gtcctttctg	tccttgagag	gatacctcca	gccatcaagt	ctactttcca	gggagggaga	37320
atgtgatgat	gaggggacag	gtaaaggcct	ttccagctga	attcctccct	gttttctaa	37380
gagctttctc	agaaacccaa	cttaatatgt	tttggtattg	gccagaattg	gaaataattt	37440
agccactctc	tatctcaat	ctagaagagt	ctggaaatgt	tttaaaactg	gcacattgct	37500
gtccctgata	aagagttgca	tttaaggaaa	aaagagagaa	tgaatgttga	attatcggtt	37560
tcatttttgc	agccagagtg	agaagttcag	agacagaggt	ttttttttta	ttgtgaagga	37620
tttaagacta	ctctcatttc	acagatgcac	taagtgaaac	aagagatttg	tatgttctat	37680
aagtcacttc	tgtcgcaatt	cctactatgg	tggagagcta	ggtaaatag	tttaattgtg	37740
cattttgtga	aattccaagac	atcatttgct	aagtttaata	catttacata	tgtttataaa	37800
gctatcttta	ttctgttggt	attatggatt	tacattgtta	ctttagtctc	agacttttca	37860
gaatctgtat	tcaggttact	taataattaca	tgtaaagtgt	tagaaagtta	ggcacttttt	37920
acattacttt	ggccacacct	ttggaaatac	atcttccctg	ctgtgctctc	ttctcctctg	37980
atcttctctg	acatgttatt	ttctttagtc	ttctgtcctt	agtaacatgt	ttaatctttt	38040
tttttttttt	ttttttgaga	cagagctctg	ctctgtcacc	caggctggag	ttcagtggcg	38100
tgatctccgc	tcactgcaag	ctccgcctcc	cgggttcacg	ccattctcct	gcctcagcat	38160
ccctagtagc	tgggactaca	ggcgcccgcc	accacgcctg	gctaattttt	tgtacttata	38220
gtagagatgg	gggtttcgctg	tgttagccag	gatgatctca	atctcctgac	ctcgtgatcc	38280
accoccttcg	gcctcccaaa	gtgaccttaa	ttttttttta	gtagctaccc	ccaccocact	38340
ttttttccct	taaattccat	cccagattag	tctactgcta	tgggtggccac	aaatctatct	38400
ggaaatggtt	gtgggttttag	tctgtaacag	cctcctctgg	ctcatctctg	atgactgcta	38460
attaatcttc	ctgaagacct	actttcactg	cacattctcc	cagggtctat	gtcactcagg	38520
gcactgggca	ttagagcaca	gacagggaaa	gacaagaact	gagcactata	cacccttgac	38580
atgggagcca	tcaaacagtc	tttcatagac	cgaagaaaac	tttcatttaa	tatgtaagggt	38640
ttatatgagg	tataacgata	tgaggaaaata	taattatttt	atcttgccct	atgattctat	38700
agcataattc	catttttctc	ttattttact	gtttgagaat	tcattgacatt	ctaaatgaaa	38760
attacagtac	aaaatatggt	gtttagagct	tttggagaaa	gaatagcaat	tttaattgctg	38820
tatctctcat	tgagatacag	ttggccctct	gtatccatgg	gtccacatc	ctctgatttt	38880
accaacctgt	gattgaaagt	atctgggaaa	aaaaaaatgc	gtctgtacat	gtacaaactt	38940
tttaaaaatt	attatttctc	aaacaatgca	atataacaac	tacttacgta	gcacttacat	39000
tgtattaggt	attgtaagta	ttctagagat	gatttaaagt	atatgagagg	atgtgcctag	39060
gttatatgca	aaatttatgc	ttttttttat	cagggaactg	agcatccatg	gattttgggtg	39120
tccatgggaa	gtcatggaac	cagttctcca	gggataccac	agggatgact	actacaagtt	39180
aatcactgt	attccagcac	tataatatct	ttagtaagaa	tctgtaatag	ctacaaaagt	39240
atctctgttt	tcaatgtaag	gttactttta	aaaactgttt	gagacaattg	tttgtccaca	39300
tgcagcgaac	cctttatcta	atctccctg	attgttacag	cttgcataac	tacagtacag	39360
tatcacaccc	aggaatttga	cattgataaa	atccatcaac	cttactcaat	gtgggttgtt	39420
tttaaaattat	tttatttttg	ttatttttaag	aattttgtctg	aaagtccatg	ttaatctcat	39480
ggattaaagg	aattgggtgct	taattttttt	agctacagaa	gtgactgtca	gagaaaaata	39540
cttcttaatc	ctttcattta	aacatttttt	tggcgatttt	ttgaaggcaa	aaaatgtgat	39600
acttctcttt	ggtgttgga	tcctagctta	tatttcagaa	aggcactttc	caatagatgt	39660
tgatggtaga	actgtcattt	ctctgttttt	ggatctaaat	ttagattata	gcattgtctgt	39720

aagatttcoct	gtcagctgaa	atggaaaact	attagcttaa	tattcoctcoct	aggacttttat	39780
ccttatacga	atgatagctg	tgcoctgagto	ttggcocttac	tttcagtttcc	ccagctctcta	39840
taaaaatgcaa	aactgactca	agatccttaa	cattccttctc	cttaacagca	cccactgtgt	39900
ctatagttata	tttcoctcttc	acttcattgt	actcctcttt	ctcaagtcac	gcattttttat	39960
atagcattttt	ttcaataccc	agtagtaaat	tcttaaaaact	acagcattttt	ccagtaccct	40020
gtagtaaatag	ctaccactta	ttgggatactt	ttattatatt	tacagcaacc	ctacaatgca	40080
gcaatttaata	tcctattgaa	catgtgtgga	aactgatagt	gggagttttt	aagtaacttg	40140
ccaaggtcac	atagctaggt	ttgacaactc	ggacttaaac	acaggtctgc	catgctcttc	40200
tgactgatcc	ttttgttagc	tttcaactgtg	taattcaactc	agttattcca	ttactgtagg	40260
cattgggcat	ctgccatgaa	aggcagtttg	agaagagaag	tttgataggc	attgaggttag	40320
aatccccaaag	acttgggtggt	ttactttatat	gggaaataaa	tagataggaa	agaatatag	40380
ataattttcca	agcttatatt	ctgagtatct	aggtaggtcg	tatgattctc	tgagttggaa	40440
aatcaaaaact	tgctcaagag	gaagagcaac	tttgagagag	tagggcagga	tggggagaa	40500
gtacataaaaa	ggagtttgta	ttctgattat	gtataaaagg	agtaaaatgt	tctgattgtg	40560
ataacaactt	tctgtaaatg	atatgtgcct	aagtaaaatg	gcacttgata	ggcttgaaac	40620
atacatttaa	ttctattgat	taaaaatccc	tctttactct	gtggggaagc	acaaagtaca	40680
tttgtttttc	tgccgtttcc	aacttcattt	ttaaaaacttt	taagacttac	tgctgtatta	40740
ctgaaaatgt	gacgtaaaat	gttatgtgcc	ccactttgca	tccaagagaa	ttgtagtttt	40800
tactgaaatc	attaccatt	tatgtaatat	tgttccgtct	aggacatgat	ccagacatgt	40860
taatgtgaaa	gatactgtga	ctaataataca	aggcagtctt	cattttttatt	gcagacaaat	40920
atcttgaaca	gttgaagtaa	ctgtttcttc	tttaagtatg	atttaagata	ctattgtaaa	40980
cttgaaattct	tttaaaatgt	ttcttttttg	attttaaaag	taatacacga	tcgtacagac	41040
atgtagaaaa	taaaacagac	agtttgttga	taatcctacc	atctacagac	aaccttggtt	41100
aatatttttg	tattttctct	ttccatttta	ttttgcagac	tgtagtgca	attttgtagt	41160
catttttttaa	atttacttat	aatcattttc	ccatattgtt	aaatattctc	taagcatgtg	41220
attttatatg	atttagatcg	cttccaattc	tttgcctga	tactgcagta	tctctttcaa	41280
tatatatttt	catctcataa	tttcttttgg	aaagacagtt	gaaagccaaa	tgccgtggtca	41340
tacataaacat	gaatatctct	taagttttta	gaaagggaacc	attttacact	tcactctatt	41400
caaaaaggcca	agaagtgata	gaaacatacc	attttattac	tcctatgaac	agtatttttt	41460
attttattttc	tttagcaaga	aaatgaaatt	gggaagaaac	gtgaactcaa	ggaagactca	41520
ctatgggtcag	ctaaagaaat	atctgtgaga	aacgttttat	taatttttat	acagatttgg	41580
cttaocgggga	ctgtcatctc	atcaattttt	gtgattttac	attcttagga	ttatttctct	41640
ttcctaatta	tggttactct	catgattgtg	ccttgaaatg	gattgatcat	ggattattta	41700
ttattattat	ttattttatt	tgtttattta	tttattttga	gacggaatct	cgctcttggt	41760
gcccaggctg	gaatgcaatg	gtgtgatctc	ggctcacccg	aacctcagcc	tcctgggttt	41820
aagctattct	cctccctcag	cctcccgagt	agctaggact	acaggcatgt	gccaccacgc	41880
ccgactaatt	ttgaattttt	aatagagacg	gggtttctct	atgttggtca	ggctgggtctg	41940
gaactcccca	cctcaggtga	tctgcccgcc	ttggcctcac	aaagtgcctg	gattacagct	42000
ttgagccacc	atgcacggcc	tggtatagatc	gtattataac	catgatgcag	tgaaaagagt	42060
atagagagaa	gccaggggtg	aattccctgc	cttctgctcc	ttaggtagtg	ggccttgaa	42120
aagtcatttt	cacatttaag	aacctcaaat	actctataaa	atgaggttga	tgcttttcta	42180
gcaggattta	tatcagataa	gagtaatgga	tgggaaatat	ttgtaaaact	taaaagttta	42240
ggctgttctt	aataatgtgc	tgattacatt	ctgtcactat	cagatgaacc	ttttttctctg	42300
actttccctt	ttttttttct	ttttgactgc	ttttatctta	gacctattag	caacttgcat	42360
attaatttatg	tagttacagc	agttaaaaga	actaagatgt	caaccttaag	cagctgtaat	42420
aatgttgatg	tgtaactgac	tagttaatag	taaatgacac	gaagccaaga	atctcatcca	42480
gcaattgaaa	gataacagga	aggactcttg	aggcaaat	aacagctatt	aatcctgaat	42540
taaaaatggc	ttgtcaatta	atgagatagt	atgtccagaa	ctgatgattg	acttttttga	42600
ggtgttaaga	ataataaaag	atacaaaactc	ttgagaatcc	caaaagttta	agaaaagttag	42660
atgaggacct	gtagaacagg	atatattata	atctcagtgt	acaattttta	tgaaaagcaa	42720
acagtgtctga	gattttgtgt	caataagata	tatatctgga	ggtaaatgtt	ttactgagat	42780
gatattttatt	agaataacta	ctaggttaaa	aatgcttcac	agtttttagc	cttctgtcac	42840
agatgagtat	gttataaatg	tttccaaagt	ttatagagca	tttgagtaag	taattttctt	42900
atcttgaaat	agctacaatt	tgattccaaa	tacaaagtcc	aggtacaaga	aataaaacat	42960
ttttactatt	ttttcaggta	tttgaaacttt	tttctataga	ttcccaaag	acaagtgact	43020
tttctttgtt	atttcttctc	tttcttacct	atccatctta	acccatttta	agaacaatga	43080
caaaacttcag	gatgatagtg	agatgcttcc	aaaaaagctg	ttattgactg	aatttagatc	43140
actggtgatt	aaaaactcta	cttccagaaa	tccatctggc	ataaatgatg	attatggtca	43200
actaaaaaat	ttcaagaaat	tcaaaaagggt	aggtatttca	actgtatcac	aagaggtcag	43260
tgtttgaaat	gttttttagag	ataccagtga	tgctaaacaa	agataaaagc	agtttatggt	43320
gaaaactgat	acttcttctg	cttaaaatgc	tttaaaaaat	tcctctagga	aggatatgaa	43380
cttacagtta	atgaatatat	tgaacacctta	gaattgaaata	gatttcatca	agattgaatt	43440

cttttagaggt	tgctggtttac	ctgggttttct	ctaccttaag	caggaagttt	ttggtgataa	43500
tcacaggatc	ttctctgtta	gtctaatatt	ggctacaac	tacttgagga	ggttcttttag	43560
ctcaggactt	tatgaagatt	aaaatgtatt	taaaataact	aagcatattc	agtaattcaa	43620
actatagtct	atattttacat	ataaaacaca	atataaatat	atatgctgag	tatgatcatc	43680
agacctgagt	ttctgctcat	taaggaactg	atacttattt	tatcagtaat	ggttaaaaaa	43740
agacttctat	ccagtaggta	ttcttttgtt	gtcttacatt	tgcttcttgc	tccagacctt	43800
cttctgactg	ctagccttta	cttatccatt	tgatcagagt	atagtaatta	ctcaaaagta	43860
atttttgtgg	agaactgctt	tcctctataa	catgatcttg	ccatgactgt	gaggtagtag	43920
agatttttct	ctctactgtg	agcattttact	attaacattt	cacagttaaa	ttagtttttt	43980
gccttctgta	atagtacctt	aagggttctg	aactccattt	gatgggaaga	atctcttcta	44040
cttagagcag	aagatggaaa	tatcttccac	ttaaattggca	ccactatacc	tttttgttta	44100
acaccacttt	ttctcacctt	atatctgagg	ctcatgaata	gcacaaaggc	attcttactg	44160
catggttact	tcattgttta	tattgtgtta	taagatctca	ttaaatacaa	attcaaaaga	44220
ctttttttat	agttttacaa	agaaacagca	gtaatgttta	ctactggcac	agagtggttt	44280
attaacaact	gaagaagtat	gaagtaatat	gaatctctgg	aaagtggttt	ggaaataactt	44340
aaaaatgtta	aaaatactgc	tatccttaac	caagtaatat	gttctgaaac	tacagaagaa	44400
atccaatcca	aaatttctat	aggaagatgt	ttaactggat	tgatattaat	gcaggaattt	44460
gtctgagttc	tttacatctc	caaatcatgc	tgggcctggg	cgctcacacc	tgtaattgtca	44520
gcacttttggg	aggccaaggc	aggtggatgg	cttgaaccca	ggagtctcag	accagcctgg	44580
gcaaatagggt	gaaacccctaa	ctctacaaaa	aaatatataa	aaattagcta	ggcatgggtg	44640
tgtctgctcg	tagtcccagg	tactcaggag	gctgaagttg	aaggatcatt	tgagcccagg	44700
aggcggagggt	tgcatgagc	caagattaca	ccactgtgcc	gggccaggta	tcagagcccc	44760
agcaccagga	agtggctaac	ttgcgggttg	gtgaaaagaa	tttaccgaca	acagtataga	44820
tttgaaaaag	gaaagtattat	tagaaaaggaa	gaacactgca	gaagaatgca	gaggggtgcc	44880
tcagcgagag	tgtaggcac	actgtggcgg	attgtcctta	ggagcattta	tggaccttaa	44940
gggtggagct	tggtattgta	aaatgagttt	caccatggca	ttccagagat	gtataaaaaat	45000
tttagttact	tataaaaagt	gaaagaggcc	tggaaatcaga	agccgacttt	agatactagg	45060
gaagtttgat	tacttctaaa	ttacccagat	aaggagtttt	gcctccagtt	agcctgtttg	45120
atgggtcacog	gttggctctt	gcccccttct	aaattgctta	gagaagaagt	tttgtctctg	45180
gggcctgttc	catggctcac	aggtgatttt	ctctctcttc	acactgcact	ctccagccta	45240
ggtgacagag	tgagaccttg	tctcaaaaaca	aacaaaaaac	cctccaaatc	aatgacatag	45300
cgtttttttaa	acttttaaaa	tactgcttag	gggtgaaaaat	aaatttaaaa	ttctctttct	45360
acttcatata	ttggaatttt	aaaagcatgt	tacaaatatt	aaggaaactgt	tactattaac	45420
aatgtttatta	actaataaca	agtatttaaca	atgatcttga	tgggcatttt	cacatgggaat	45480
tttcttttct	taaagcacct	ctttactagt	aaacaattta	aatatcaatt	agaagtataa	45540
attgttggca	tccccaacat	ctcctgcttg	gactctgtga	actggaaaagt	tttgaaaaag	45600
atttaaat	tcattcaatat	tagaaaaggc	ttaagctttg	aagtcattag	aacaaaaatc	45660
agtgctttga	attgtatgtg	ttgtgttcat	cttgagttgc	tttaattgtt	aaatgataag	45720
gtaaggccat	tttaaaataa	aaactccaaa	tgaaaagtgt	taaattattt	tttaatacata	45780
aatcccatga	catgtocaga	tctgtatata	gtaatagcta	taaaagaagg	gcaaaaaacag	45840
atgggttttag	aacagagttt	ctgctctcac	ttttatttgt	agaatataaa	catcttttggc	45900
acttatgcat	gattttaccat	ctttgctttt	taatcttttt	aaaaaaatgg	tcattttttgt	45960
ttgttaatat	actttactgt	actactttta	ttattcaata	ggtoacatat	cctggagcag	46020
gaaaacttcc	acacatcatt	ggaggatcag	atctaatagc	tcattcatgct	cgaagaataa	46080
cagaactaga	agagtggcta	aggcaggaaa	tggaggttag	taggaagtga	ggcccagaaa	46140
cttgcttaaa	ttgcactttg	gtccattatg	gtggccttca	agcaaattct	tcttaaaacc	46200
aaattaaaat	aagtgcata	aagtcattca	ttcaggagca	ttcctgagtt	acagagcatt	46260
aatctatacc	cttccataac	acttctttta	aagaatacta	aattttattt	tgttaaaaaa	46320
aaaaaaaaag	gtgagacctt	agaaattcag	tttacatcct	aatgaaaagg	gggagataaa	46380
agccacaaaa	atttaaggga	aactaaaaga	atgtggagga	tattacaaat	atatcactta	46440
aatgtatgtc	aagggaactg	ccttttttaa	cttggggatt	tggtttttac	aattctgaaa	46500
atcttctatt	cattctcttg	aatattagtt	acctttttac	tggttttccc	attatctcct	46560
tctggaattc	caacttaacg	taagttaaatt	tttcttttcc	atctgtcttt	cctgtgtatt	46620
tcatttcttt	gtttccctgg	gttatatttt	tggcaactgc	tgcatatcat	cttccgattt	46680
actactactg	tcttcaactc	tagttggcat	tgcatccgtt	cattttattt	ttcattactg	46740
gaagtctgtt	ttatttcttt	ctaaatcttc	ttgttccttg	ctgtttttca	agcttccctt	46800
tttatattat	ttgcctaatt	ataccattac	ctaaaatgtt	tgatctgttt	tctgctctta	46860
tgtacctgtg	tttcaagttt	gtgctttgtg	atcttttgaat	atgagctgat	tggtttcttt	46920
gtaactcgat	ctgtagggtt	ttcttgagta	ttaagttcag	atgtatttcc	tctagaaaaa	46980
atacgttttc	tatcttcgag	tcttctacca	atatgagacc	acttcaaatt	aaaatctctc	47040
cttgtgatcc	tttgaatcac	ccagacagtt	agtatgtatt	aatatttggg	ccagaagctg	47100
gagtgaatga	aggctggctt	atcattagaa	acttcaaatt	agatttttat	ttatttctct	47160

cactaagtgc	cagaatgaag	atgggcaagt	ttcttttcta	gtccttctg	tgttgtaagg	47220
tttttttctc	tttcttcttt	tagtgctggg	tcttttatta	aagtcaacat	cttgggtttt	47280
ctttcgtatc	actcataccc	cgtatagaca	ttaaagcaga	gttcagggtt	ttcatgactt	47340
gcagatactc	atagggcaag	gcaaaagctg	actgtgggtc	ttgctaacct	ctcaggggtt	47400
cttatttttg	tttatagtgg	gtatagtgtg	attcactttt	aaaagtgtt	ttttctcagt	47460
tatttttaaa	taagggttat	ttaggaaagt	cacttatgaa	agtagagtgt	ttaagggtcac	47520
tcaggatact	tattttttaa	aaatgaaaga	atggaaatca	catcctttct	ccttttcttt	47580
tttgaagaa	taattggctt	attttgtaac	atgtgcattc	cacagaatta	tggcagtcac	47640
caaagaatga	agatgtgaaa	acctaaagcc	cagaaattac	ctattttaaac	agttaagtga	47700
acaatattcc	agacatctct	tcattgagga	gtagtggag	gcagggaac	actgggaagg	47760
aagagagaga	cattgtaggg	aggaagttaa	actgaaggca	ttgctgaatt	tctataaatg	47820
tttcttccct	ccaagatatt	ttattttgtg	agatctgtct	aatattaagg	aggaaaacta	47880
taaaaatcac	tgtgaagtgg	aatgggtagt	tttaaaactc	atattaactt	cacatacaat	47940
tatttgttgg	ctcgctacag	tgaaaagtga	ggacattatt	agtacttctc	cccacctagc	48000
ctcccttacc	ctgttccagt	ctgttttttc	ctgttttagg	tgactttgcat	gcattgacag	48060
tcctctttct	taagctcgaa	agccagtaac	actcagaata	catctcagtg	ttgatcattc	48120
tccattagtt	tttccctgaca	tatagtatgc	tgttttgatt	tgcagggtga	attctctttc	48180
tcaaggaaat	tttttctatt	atatatttta	aatattttat	atttgcctgg	ctctctataa	48240
gacatttaag	acataactat	cctttcattg	gattaccctt	gtcgtccaca	tctatttttt	48300
ctgcattcac	tgtggttttc	ttaggctctt	tcactgtatc	aaaattttac	atttcagggtg	48360
tgtctataat	gtttctcacc	aagtatgtga	ccttaggcaa	attacttaat	gtctctgctt	48420
ccatctgtgc	agaatgagaa	taataatagt	acctttattt	cacagacata	tgaggattaa	48480
atcatagata	acataataat	catttataac	agtggaagt	gttagctatt	tctaatttaa	48540
ttctgaaagg	ctgttattat	ggttctttta	ccttagcattt	gttctttttt	catttcattg	48600
ttctattatc	tgtttttttg	tcattatttc	attgtcttca	tgtttctatt	ttacttttta	48660
ttcgtggatt	attattttct	gcagattagg	ttctttatct	gttttttgca	tgttctgttc	48720
caatatccct	tttttttttt	ttcctctagt	agatggagta	gcttttctgt	ttttttcttt	48780
cacttgagta	aagggaaatg	tcttttccag	atattctgtt	tgctacataa	aggatcatat	48840
gccatctcat	gcagggatta	cattcagaag	ccagtttgtg	agacagaaat	tcagtataat	48900
caaaattact	tctaaacttc	ttgtcttgcc	cataagaaca	gaattcagcc	aggcacaatg	48960
gtgtggctca	tgactataac	cccagcactt	tgggagcagg	aggatcactt	gaacccggga	49020
gttaagagta	gcctgcacaa	catcttgaga	ccctgtctct	acaaaaaaat	aaataaaatg	49080
aaattaaaca	aacaaacaaa	aaaacacaac	aaattagcgg	gtcatggtag	tgcatgtgcc	49140
catagtccca	gctactcagg	aggctgaggt	gggaagattg	cttgagcctg	ggagggttaag	49200
gttgcaagtga	gccatgattg	agcccctgca	cttcagcctt	ggtgacagag	caaggccaca	49260
tctcaaaaat	aataaaataa	aataaaataa	aaattaaaga	acagaattcc	ctcatgcctc	49320
actgtcagta	tggcattatg	ctgaaacagt	cagtggcaca	tggcatatcc	catctagttt	49380
ctgttgtctg	aagacattga	atctgggaga	ggaaaaggct	agctggagct	gtgtgcagct	49440
tgggctagct	gtctcctggg	attttaatta	aatgtcctat	accaggaggt	gtgccctata	49500
taaaagagaa	taacctagca	ttattagggt	ttttacctaa	tttgttaggg	atccttgagg	49560
cctatgtgtt	tggtcagtg	cagccctgct	tctttacctt	ctacaccatt	agtcccttcc	49620
cagcagccca	ctggcagttg	ttttccctgt	tcagggttacc	ttttccocaa	atttggggga	49680
ttagtaagaa	tcctcagggt	tgaccagttg	tgtagcaott	ttaatggatt	gagacagtat	49740
taggaatcag	ctgcacaga	atcatttgg	tctttttaca	gctgcaottt	ttaagcgtat	49800
ggcatggctt	aaactcttct	ccttgattaa	ttaacactgt	cgagttttgt	ttgatttaatt	49860
ttagatggga	gaagttagaa	gaatgatgat	acatcataca	gctgctgact	tttttctatt	49920
ttttttttgc	ttatttcatt	aggaattaga	tggactgtgt	tctagatgat	ttcaccaaat	49980
cacttctctt	tttgcctaga	tcatttttag	tgctattggg	aggacttact	ctataacaga	50040
cttgacttgc	ttttgctgca	tggctaactg	ttatttatgt	aaatgttctg	tactgccatc	50100
tcatttccct	gtttgctgca	gctattcttt	ttctatatcc	cctccctatt	tttctttttc	50160
atcccttctt	tctctaactc	tgctgcagac	ccaccagttc	tgattttctc	aatcactgcg	50220
tcagttcctg	aagttccctt	gaatttagga	tattttcatt	gtgtacatca	aacataaaaa	50280
ttatttgaac	tgtatccaac	ctgatttgaa	tttgaagac	tgtgagtagt	agttatctca	50340
gacctctgaa	aaatgccagt	aatatgaggg	atttctgttt	cttaataacta	tttttatatg	50400
ttttactgaa	atataatgaa	taaaactgct	ttctcctcag	tggtttttcc	ttactatgct	50460
acaactttat	tccccaggca	acctctaaga	atgttttagaa	aaatgttgcc	agtagttatt	50520
ttgacagctg	ttttattaaa	atgatgtott	cccattttatg	ttttgctatc	cctattagaa	50580
aatatgaaaa	gataagatgt	aattttgttt	cactatatga	tagaaaaatc	agtctgtaag	50640
atcgaatccc	tgcaagtcc	tctttagggc	ttgctctaga	gattcagaag	ccctgaggca	50700
gcctcgtaaa	gagctgggtg	tcttaataag	gtagacctgg	tcaaatccca	gctattccat	50760
ctgagttccc	ctatcttctg	caggtttacc	taacctaaagt	ctctgttacc	tcattgggtta	50820
aaactgagat	aatagtataa	tagtaatgaa	gttacatgaa	gattaagtga	gatttcatat	50880

atatatatat	acacacacac	atatagagag	agagagagag	tttaagatag	tatctggaag	50940
cattcaaatg	taaattagta	acagtaaaaa	taaacacagt	aagtccttaa	cattgtcagt	51000
aggttttttg	aaactgcac	tttaagcaaa	attacataac	caatatTTTT	tctcattatt	51060
acaacaaaa	aacatgatc	aaggaactgc	tgtatgtcat	ctcacttaca	gttgcagttt	51120
ccaagaaata	tcaaaaacat	taagtcagga	cttactctat	ctgtatttaa	ggaacttctg	51180
gtcttttaga	gaggataggg	tacaaatata	aataattata	acagaaggta	gaaattgata	51240
agcatcctgg	gaattctgta	gctgaagttt	tgggagagtt	cttcacagca	ggcattatTT	51300
ttagaagga	gggatcagga	agcctttgct	aaagagggga	agaacatggt	ccttgaaaca	51360
tagtaggcac	taaataagta	ttgaatgaat	gtacctttaa	agatgggtac	atgtgggaag	51420
agggaaaaaa	aggaattaac	ttccttgcca	gagggagaaa	tatgaacaaa	agcagataga	51480
gggtcacagg	atatttatta	ggagatgatt	ctggggtttt	gttttggttt	tgtctttttt	51540
ttttttgtgt	gattcagttt	taaccggcat	acagagtcca	cgaagaggag	gctgagaagt	51600
gattagggaa	gtaaaatgga	accaggttat	gaagagcctt	gcacatttca	gcgggtcaaa	51660
tgaagggtct	tgtgttttcc	ttggtaggtg	ggagaagtca	cgaagggttt	caaattgcat	51720
atgataaggg	catagctaga	ctttaggaag	atgcactcag	cacaggaggt	ttttgattct	51780
gactctgtaa	gggtcgtag	aagtttagtg	agtttgtatt	taaaaggact	tcagaggaga	51840
ggtaatttag	cagcagcttc	taagccctga	tgtgggacca	agaacacagg	agcctcttta	51900
actgtggagc	tgtctagtgt	gaaggtgggg	taaatgttgc	cctcttagtc	tcactcagtgg	51960
tctgaccccc	aagcactgaa	atctcattta	gtaaaagggg	tttgctggaa	agagtgttta	52020
aaaactcagc	aagctagcaa	tatactattg	gttgcctttg	agtggagatg	gggtgggagaa	52080
agcttgttag	tgatcctctt	tttgtaatga	tgtattcatt	gattgaaat	atagaggatc	52140
agttgaatga	aatattgtag	aggcaagaac	tcagatgtgg	tgacctccag	gatgtggaaa	52200
tctctaagat	gacagtgaac	tatcactata	gcaattcatt	aactatata	tcaccactga	52260
gcaaatgttt	gaaattatgt	taattttgac	aggtacaaaa	tcaacatgca	aaagaagagt	52320
ctcttgtcga	tgatcttttt	aggtaaagtt	tgtttcacct	ttctcatgta	cctttgagag	52380
atgtatataa	aattttagtt	tgttcataga	aatlaagaat	ttgtttcttc	tgtcctcata	52440
gacacctagt	cccttcacct	aacacaagtg	tttattttta	ttacttaagc	acctctcaat	52500
tgggtttatt	ggctatagca	tcgaggtttg	gggttaagtt	ataagatact	taaaattttgt	52560
atggggggcat	tcaggcaaaa	agacgggtcc	cgaattgtgt	gaaattgttg	tatagatttg	52620
tgagattttt	cagctctgag	tagaattacg	atttagtttt	gaattaaagc	aagtaaaatg	52680
ccagaccatt	tgttttagttt	ttattggcac	atgcataaaa	acaaaagggt	agattaaagt	52740
ttcaaagcag	gtttttgtgg	gaggttttag	agttgtactt	tgtgattata	atttaattct	52800
gatttaatac	attttcagca	ttcctgcagg	cctaacaac	ctattataat	aattgcctct	52860
gaaataactaa	taaaatacta	tattataggt	agatatcagg	ggagaagaca	gaatgaagaa	52920
attatbtttg	agtctgtttt	gcagccaatt	agattgatcc	tctaatttca	taactgacag	52980
tataaattgc	tggtaaaaa	gttgacaaac	aggccgggta	atcctagcac	tttgggaggc	53040
tgaggtgggc	ggattacgag	gtcaggaggt	caacactagc	ctggccagca	tggagaaacc	53100
cgctctctac	taaaaataca	aaaattagcc	aggogtgggt	gcctgcacct	gtaatccagc	53160
ctactcagga	ggctgaggca	ggagaatcgc	tgaaacccag	gaggccgagg	ctgctgagc	53220
caagatcgcg	ccactgcact	ccagagagag	actccatctc	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	53280
gtgttgacag	acaatactgg	tttttcatta	gtcaaatgag	atgggttggt	cagccattat	53340
tgttttaactg	ctgtaggaga	aatgtttgta	aagtgtctaa	tacattttaag	tagattatgc	53400
tcttttgtgc	aaatgatatg	cttttattat	ggggaggaat	ggggatcttt	gaagccatac	53460
agaaagaagt	gtaaacatac	cttcattttt	aaactgtttt	catttaattat	tttaaaagctt	53520
taaaggattt	ttgttattgt	tgtttttttt	tttgttttta	ccatattttc	atcaaagcaa	53580
catcaaaggg	atcacatgaa	ataaaaatgt	cagtgtcttag	tatctgatcc	taaggacaaa	53640
attgtcattc	ccatcctatt	tgccaaagtg	tgactacagt	ttgaaagtcc	tttaccttta	53700
aaagaaatac	catcccttat	ctaaaatatca	tttaacccca	tttctttctt	tgagataaca	53760
atccttattt	aaaaaggaga	agataactga	ggatttttaa	aagaagccat	ggaaaaactt	53820
cctagtaagc	atctacttca	ggccaacaag	gttatatgaa	tatatagtgt	atagaagcga	53880
tttaagttac	aatgttttat	ggcctaaatt	tattaaataa	aatgcacaaa	actttgatcc	53940
ttttgtatgt	aacaattggt	tgttctgttt	tcaggctttg	tcattgcatac	tttttttcat	54000
ttttaaatgt	gttttgttta	ttaaatagtt	aatatagtca	cagttcaaaa	ttctaaatgt	54060
acgtaaggta	aagactaaag	tcacctttcc	accattgtcc	tagctacttg	gttccctcca	54120
gaaaaaaatt	catgatactc	atctcttatg	aatctttcca	gggatttttg	agtcctatcc	54180
aaattccctat	ttttaaataa	tttctacac	aaatgatagc	ataacatag	cagtgtttcta	54240
caccttgctt	ttttacttag	tagattaaaa	attataggaa	tatcaatata	atgttttttaa	54300
tattttttct	tttccattat	gctgtagtct	tacctaaact	ctggtgatcc	aaacaaaaatg	54360
gcttcagtg	tgcagatgtc	acctacatgt	tattctagta	ctagaaactg	aagaccatgt	54420
ggagacttca	tcaaaacatg	gttttagttt	caccagaatg	gaaagacctg	tacccttttt	54480
tggtggtctt	actgagctgg	gtgggtgtct	gttttgagct	tatttagagt	cctagttttc	54540
ctacttataa	agtagaaatg	gtgagattgt	tttctttttc	taccttaag	ggagatggta	54600

```

agaaacaatg aatgtctttt ttcaaaacttt attgacaagt gatttttcaag tctgtgttca 54660
aaaatatatt catgtacctg tgatccagca agaagggagt tccagtcaag agtcactaca 54720
actgattagt tgtttagaga atgagaaatg gaacagttag gaatggaggc catatttcca 54780
tgacttccct tgtaaacaga agcaacagaa gggacaagag gctggcctct acatcactct 54840
caccttccaa atcttgtgga agtgcactca cttgccagaa ccaaattaac ttacttccaa 54900
gttctggctg cttgcagggt gaactccagc tgcaagggag ttaggggaaat gaaggtcttt 54960
ttttaaaagc ttctcagcct tcctagggaa cagaaattgg gtgagccaat ctgcaatttc 55020
tactacaggc attgagacca gtttagattat tgaaatatta tagagagtta tgaacactta 55080
aattatgata gtggtatgac attggataga acatgggata ctttagaagt agaattgaca 55140
gggcatatta gttgatgaaa tggagtcaat tgagtctctt aatagccatg tatcataatt 55200
accaagtga gctgggtgga catatggtct ccattttaca gttaaggaat ataattggaca 55260
gattaatatt gttctctgtc atgcccacaa tccttttcta aggaagactg ccctactata 55320
gcagttttta ttttgtcaa tttatgaata taatgaatga gagttctggt acctcctgtc 55380
tttacaataa ttggtgttgt cagtattttt cctttttaac cattccaatc ggtgtgtagt 55440
gatgtttcat tttggtttta atttgtatat ccttgatagc tataattggg tcatagaaat 55500
tctttataca ttctagatgc aagtctcttg tcggatatat gtattgagat attacaccta 55560
gtctgtggct tgactgtttt ctttatgtct tttgatgaat agaagtttta aattttgaca 55620
agggtcaaatt tttttttttt ttttgtttga ttttttttct ctccaattta accccaagat 55680
ttcagatatt ctgctctatt atataaaact tatattttta ttttgtgat ctaccttgaa 55740
ttgatatgta tgttgtgaat tatggatcag ggttcttttt ttcccecata caagtatcca 55800
gtcattgtaa cactgtttat tgaagaatt atcctttcct cattaaatta ccttgccaat 55860
tagtaaaaaa tcaatttaacc ataattgggtg atctgtttct ggactttctg tttggttaca 55920
ctgaaatgtt tgtccatcct tgcactcact cataccatac tgccttgaat tactgtagct 55980
gcatagatgc tccttaagtt gggattacat tgtaataaac gcaatgtaag ttgaaaatac 56040
tgtatttaag tcaaaagtgc atttaataca ccttaaccta cgtcatagct tagcctagcc 56100
taccttaaat gtactcatga cacagtagcc tatagttggg caaaatcatc taacacaaaa 56160
gctattttat tgtaaaagtac tgaatatttc atctaattta ttgaatagta aactgaaagc 56220
aaaaaacaga atgatttgtt agctactcac tataaacata cacagctgaa agcgactgg 56280
gcctgaagaa tgtttgaagc attgaactaa aattgcggca tgatggggaa tactacagca 56340
acaggattat caatttccct actgattagg cttgagttaga agcattggtt gaaggcacta 56400
agggcaccaa tacttgatgg tttagcagga atagtgtctt tcacaaagag caagaatcag 56460
tttttacctt cttgatgctg tggctgacgg gaagc 56495
<210> 6
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens ;
<400> 6
cacctcttga tgaaccatct 20
<210> 7
<211> 22
<212> ДНК
<213> Homo sapiens ;
<400> 7
cgtttaacaac tactgataag ag 22
<210> 8
<211> 21
<212> ДНК
<213> Homo sapiens ;
<400> 8
ggacggcagg aaagaaatct t 21
<210> 9
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 9
tccagcagag aaagggttat 20
<210> 10
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 10
ggcaaagaga actcatcaga 20

```

<210> 11
<211> 16
<212> ДНК
<213> Homo sapiens ;
<400> 11
cccccccca aaatgc 16
<210> 12
<211> 20
<212> ДНК
<213> Homo sapiens ;
<400> 12
gggttaggg aagtgcagaa 20