ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ &
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Διατμηματικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών
«Πρωτεϊνική Βιοτεχνολογία»

«Μελέτη Αντιγονικών Πρωτεϊνών της *Legionella pneumophila*»

Μυρτώ Κουτάντου

Υπεύθυνος Καθηγητής: Γεώργιος Τσιώτης

Ηράκλειο, 2020

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στον τομέα Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, στο Εργαστήριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Μικροβιακής Παθογένεσης της Μονάδας Ζωονόσων της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης καθώς και στο Molecular Membrane Biology Department του Max Planck Institute of Biophysics στη Φρανκφούρτη της Γερμανίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου Γεώργιο Τσιώτη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω υπό την επιστημονική του επιμέλεια αυτήν την μελέτη. Ακόμα, να τον ευχαριστήσω από καρδιάς για την απίστευτη ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο Max Planck Institute of Biophysics. Επίσης, να τον ευχαριστήσω για τις συμβουλές, την καθοδήγηση, την ενθάρρυνση, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και φυσικά για την άψογη συνεργασία που είχαμε τα τελευταία τρία χρόνια.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Άννα Ψαρουλάκη, της Ιατρικής Σχολής, για την άψογη συνεργασία που είχαμε τα τελευταία τρία χρόνια, για τις συμβουλές, την καθοδήγηση και φυσικά για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκτελώ πειράματα στο εργαστήριο της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Παυλίδη, του τομέα Βιοχημείας, για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και συνεργασία που είχαμε τον τελευταίο χρόνο.

Ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Δημοσθένη Χοχλάκη για την απίστευτη συνεργασία μας όλον αυτόν τον καιρό και φυσικά για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε, επιστημονικές και μη.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Dr. Hao Xie που δέχτηκε να δουλέψει μαζί μου, να μου μάθει τόσα πολλά πράγματα και να με βοηθήσει στην εκπόνηση αυτής της έρευνας. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τον χρόνο που μου αφιέρωσε, για την προθυμία του να με διδάξει, για τον πάντοτε φιλικό του χαρακτήρα και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Ευχαριστώ πολύ τον Prof. Hartmut Michel για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο Max Planck Institute of Biophysics, στο Molecular Membrane Biology Department.

Από το εργαστήριο του Max Planck Institute of Biophysics ευχαριστώ ιδιαίτερα την Radhika Khera που μου έμαθε τόσο πολλά, αλλά κυρίως για το απογευματινό μας παγωτό, για τα νόστιμα φαγητά που μου μαγείρευε, που με ανέχτηκε και φυσικά για την πολύτιμη φιλία της.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Conny Muenke από το Max Planck, στην Σοφία Μάκκα και σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου της κυρίας Ψαρουλάκη, στην Ειρήνη Μαθιουδάκη και σε όλα τα παιδιά του εργαστηρίου του κυρίου Τσιώτη καθώς και στα υπόλοιπα παιδιά του τομέα Βιοχημείας του τμήματος Χημείας.

Τη διπλωματική μου την αφιερώνω στον παππού μου Guido για την οικονομική υποστήριξη όλον αυτόν τον καιρό, στους γονείς μου Μιχάλη και Νίνα και στα αδέρφια μου Ξανθίππη και Γρηγόρη για την υποστήριξη τους, στον ανιψιό μου τον Γιώργο που μου έφτιαχνε την διάθεση όλον αυτόν τον καιρό, στον ανιψιό μου τον Μιχάλη που θα είναι το καλύτερο δώρο αποφοίτησης και φυσικά στον Κωνσταντίνο, που με άντεξε και με στήριξε.

Περίληψη

Η *Legionella pneumophila* είναι ένα Gram – αρνητικό, αερόβιο κι ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο του γένους *Legionella,* το οποίο εντοπίζεται παγκοσμίως και αναπτύσσεται κυρίως σε υδατικά συστήματα. Παρασιτεί σε αμοιβάδες και πρωτόζωα, όμως μπορεί να προσβάλει τα ανθρώπινα κυψελιδικά μακροφάγα και να προκαλέσει τη νόσο των Λεγεωνάριων, μία άτυπη πνευμονία που μπορεί να αποβεί ακόμη και θανατηφόρα σε συγκεκριμένες περιπτώσεις.

Πολύ σημαντικό για την αντιμετώπιση της νόσου των Λεγεωνάριων είναι η έγκαιρη διάγνωση, προκειμένου να χορηγηθεί άμεσα η κατάλληλη θεραπεία. Οι υπάρχουσες τεχνικές διάγνωσης είτε δεν είναι πολύ ευαίσθητες, είτε είναι πολύ αργές, είτε δεν είναι ικανές να ανιχνεύσουν όλα τα στελέχη και τους ορότυπους της *Legionella*. Επομένως, υπάρχει ανάγκη για την ανάπτυξη ενός γρήγορου, ευαίσθητου και αξιόπιστου διαγνωστικού τεστ.

Στην συγκεκριμένη έρευνα έγινε προσπάθεια για την εύρεση αντιγονικών πρωτεϊνών της *Legionella pneumophila* με σκοπό να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία διαγνωστικού τεστ.

Χρησιμοποιήθηκαν 43 περιβαλλοντικά στελέχη, 2 κλινικά στελέχη και οροί από ασθενείς με νόσο των Λεγεωνάριων. Έγιναν ELISA και Western Blot χρησιμοποιώντας τους ορούς, ταυτοποίηση πρωτεϊνών με MS, επιλογή πρωτεϊνών-στόχων, κλωνοποίηση, έκφραση και απομόνωση τους και έλεγχος της αντιγονικότητάς τους με ELISA και Western Blot.

Λέξεις κλειδιά: *Legionella pneumophila* serogroup 1, Αντιγονικές πρωτεΐνες, Διάγνωση, ELISA, Western Blot

Συντομογραφίες

A_{XXX}: Absorbance at xxx nm
AYE: ACES-buffered Yeast Extract
BCA: Bicinchoninic Acid
BCIP: 5-bromo-4-chloro-indolyl-phosphatase
BCYE: Buffered Charcoal Yeast Extract
BHI: Brain Heart Infusion
BSA: Bovine Serum Albumin
CV: Column Volumes
DDM: n-Dodecyl-β-D-Maltoside
DNase: deoxyribonuclease
dNTP: deoxyribonucleotide triphosphate
DDM (=LM): n-dodecyl-β-D-maltoside
DMSO: dimethyl sulfoxide
DNA: deoxyribonucleic acid
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EtBr: Ethidium Bromide
Fw: Forward (primer design)
IPTG: isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
MES: 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid
MOPS: 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid
MS: Mass Spectroscopy
MW: Molecular Weight
Ni-NTA: nickel nitrilotriacetic acid
OD_{XXX}: optical density at xxx nm
PBS: Phosphate-buffered saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
Pefabloc: 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
pI: Isoelectronic point
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF: polyvinylidene difluoride
Rev: Reverse (primer design)
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Tris: tris-hydroxymethyl-aminomethane

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή 9
   1.1 Legionella pneumophila 9
   1.2 Κύκλος ζωής βακτηρίου 10
      1.2.1 Αναπτυξιακή μορφή 12
      1.2.2 Μεταδοτική μορφή 13
   1.3 Παθογένεια 13
      1.3.1 Νόσος των Λεγεωνάριων (Legionnaires' Disease) 14
      1.3.2 Πυρετός Pontiac (Pontiac Fever) 15
   1.4 Διάγνωση 15
   1.5 Θεραπεία 15
   1.6 Ανοσολογική απόκριση - Αντιγόνα 16
   1.7 Σκοπός Εργασίας 17
2. Υλικά και Μέθοδοι 18
   2.1 Καλλιέργεια της Legionella pneumophila 18
      2.1.1 Στερεή καλλιέργεια 18
      2.1.2 Υγρή καλλιέργεια 18
   2.2 Λύση κυττάρων με ωσμωτικό σοκ 18
   2.3 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης (BCA) 19
   2.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 19
   2.5 Μονοδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) 20
   2.6 Δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου 2DE (IEF/SDS) 21
   2.7 Ανοσοαποτύπωμα (Western Blot) 21
   2.8 Φασματομετρία μάζας (Mass spectrometry) 22
   2.9 Κλωνοποίηση πρωτεϊνών 22
      2.9.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από την *Legionella pneumophila* 22
      2.9.2 Σχεδιασμός εκκινητών (primers) 23
      2.9.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) 23
      2.9.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 23
      2.9.5 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης 24
      2.9.6 Εισαγωγή DNA σε πλασμίδιο pMini (Ligation) 24
      2.9.7 Μετασχηματισμός (Transformation) 24
      2.9.8 Απομόνωση πλασμιδίου 25
      2.9.9 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα 25
      2.9.10 Νουκλεοτιδική αλληλούχιση (Sequencing) 25
      2.9.11 Εισαγωγή DNA σε πλασμίδιο pET22b(+) 26

2.10 Έλεγχος έκφρασης πρωτεϊνών 27
2.11 Απομόνωση πρωτεϊνών-στόχων 27
2.11.1 Καλλιέργειες 27
2.11.2 Λύση κυττάρων 28
2.11.3 Απομόνωση υδατοδιαλυτού πρωτεϊνώματος 28
2.11.4 Απομόνωση μεμβρανικού πρωτεϊνώματος 28
2.11.5 Διαλυτοποίηση μεμβρανικών πρωτεϊνών 29
2.11.6 Χρωματογραφία συγγένειας (Affinity Chromatography) 29
2.11.7 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Size Exclusion Chromatography) . 30
2.12 Blue Native Page 31
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση 32
3.1 ELISA 32
3.2 SDS-PAGE και Western Blot στελεχών με διάφορους ορούς 32
3.3 Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση 2DE IEF/SDS-PAGE 35
3.4 Επιλογή πρωτεϊνών-στόχων 35
3.5 Κλωνοποίηση στόχων 36
3.5.1 PCR 37
3.5.2 Εισαγωγή DNA σε πλασμίδιο pMini 39
3.5.3 Εισαγωγή DNA σε πλασμίδιο pET22b(+) 41
3.6 Έλεγχος έκφρασης 45
3.7 Απομόνωση Πρωτεϊνών 46
3.7.1 Elongation Factor G 47
3.7.2 Elongation Factor T 48
3.7.3 27 kDa Outer Membrane Protein 49
3.7.4 Elongation Factor T2 50
3.7.5 Dihydrolipoamide Succinyltransferase 51
3.7.6 Major Outer Membrane Protein 53
3.8 Μελέτη των καθαρών πρωτεϊνών με SDS-PAGE 53
3.9 Μελέτη των πρωτεϊνών στόχων με Native PAGE 55
3.10 Έλεγχος αντιγονικότητας των πρωτεΐνών-στόχων με Western Blot 56
3.10.1 Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-στόχων με μείγμα ορών ασθενών *Legionella* 56
3.10.2 Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-στόχων με ορούς από τον ίδιο ασθενή *Legionella* από διαφορετικούς χρόνους 57
3.10.3 Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-στόχων με ορούς από αιμοδότες (Negative controls) 58

3.10.4 Έλεγχος διασταυρούμενων αλληλεπιδράσεων με την *Coxiella burnetii* 59
3.11 Έλεγχος αντιγονικότητας πρωτεϊνών-στόχων με ELISA 60
4. Συμπεράσματα 61
4.1 ELISA με στελέχη και ορούς 61
4.2 Επιλογή πρωτεϊνών-στόχων 61
4.3 Κλωνοποίηση στόχων 61
4.4 Απομόνωση πρωτεϊνών-στόχων 62
4.5 Έλεγχος αντιγονικότητας 62
4.5.1 Έλεγχος με Western Blot 62
4.5.2 Έλεγχος με ELISA 63
5. Μελλοντικοί Στόχοι 64
6. Βιβλιογραφία 64

1. Εισαγωγή

1.1 Legionella pneumophila

Η *Legionella pneumophila* είναι ένα Gram – αρνητικό, αερόβιο, πλειομορφικό, ευκαιριακά παθογόνο βακτήριο του γένους *Legionella* το οποίο διαθέτει μαστίγιο και δεν σχηματίζει σπόρια. Ανήκει στην οικογένεια των *Legionellaceae* και αποτελείται από βάκιλλους πλάτους 0,9 μm και μήκους 2-20 μm. Έχουν βρεθεί μέχρι τώρα 58 είδη του γένους *Legionella* και πάνω από 70 διαφορετικοί ορότυποι [1].

Η *Legionella* ανακαλύφθηκε πρώτη φορά έπειτα από μία επιδημία πνευμονίας το 1976 στη Φιλαδέλφεια των ΗΠΑ, σε ένα συνέδριο των βετεράνων της Αμερικανικής λεγεώνας. Συνολικά νόσησαν 182 άτομα, εκ των οποίων οι 29 κατέληξαν. Αιτία της «μυστηριώδους ασθένειας» ήταν το -μέχρι τότε άγνωστο- βακτήριο *Legionella pneumophila* (*Legionella* από τους Λεγεωνάριους και *pneumophila* από την μορφή της νόσου) [2].

Αναπτύσσεται σε υδάτινα και εδαφικά οικοσυστήματα, κυρίως σε υγρότοπους, λίμνες, θερμές πηγές και περιστασιακά σε τεχνητά συστήματα διανομής νερού. Έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν βιομεμβράνες (biofilms), από τις οποίες τρέφονται οι αμοιβάδες και τα πρωτόζωα. Η *Legionella* παρασιτεί τις αμοιβάδες και τα πρωτόζωα (κυρίως *Acanthamoeba, Hartmanella, Tetrahymena* και *Naegleria)* από τα οποία επωφελείται [3][4].

Είναι παρούσα σε πηγές γλυκού νερού παγκοσμίως, αλλά οι ποσότητες της σε αυτά τα περιβάλλοντα δεν επαρκούν για να προκαλέσουν ασθένειες. Η ανάπτυξη και μετάδοση της *Legionella* μπορεί να συμβεί οπουδήποτε στον κόσμο εφόσον υπάρχουν οι κατάλληλες συνθήκες. Οι συνθήκες αυτές είναι οι θερμοκρασίες ζεστού νερού (20°-50°C), η στασιμότητα του νερού, η παρουσία βιομεμβρανών, τα οξείδια του σιδήρου που δημιουργούνται στις σωληνώσεις και η απουσία απολυμαντικού [5].

Είναι πολύ ανθεκτικό βακτήριο, επιβιώνει στους 50°C για 30 λεπτά και στους 60°C για 3 λεπτά. Δεν αναπτύσσεται σε κοινά βακτηριολογικά θρεπτικά, παρά μόνο σε ειδικό θρεπτικό, το οποίο περιέχει μία πηγή αμινοξέων τα οποία αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας της (κυρίως η κυστεΐνη). Επίσης, το θρεπτικό περιέχει μεταλλικά ιόντα και κυρίως ανόργανο σίδηρο, ο οποίος διευκολύνει την ανάπτυξή της. Οι αποικίες εμφανίζονται μετά από επώαση των ειδικών τρυβλίων, στους 36°C (ιδανική θερμοκρασία) για 3-5 ημέρες [6].

Ο αριθμός των περιπτώσεων της νόσου των Λεγεωνάριων αυξάνεται παγκοσμίως. Στις ΗΠΑ έχει αναφερθεί αύξηση κατά 350% από το 2000 έως το 2016.

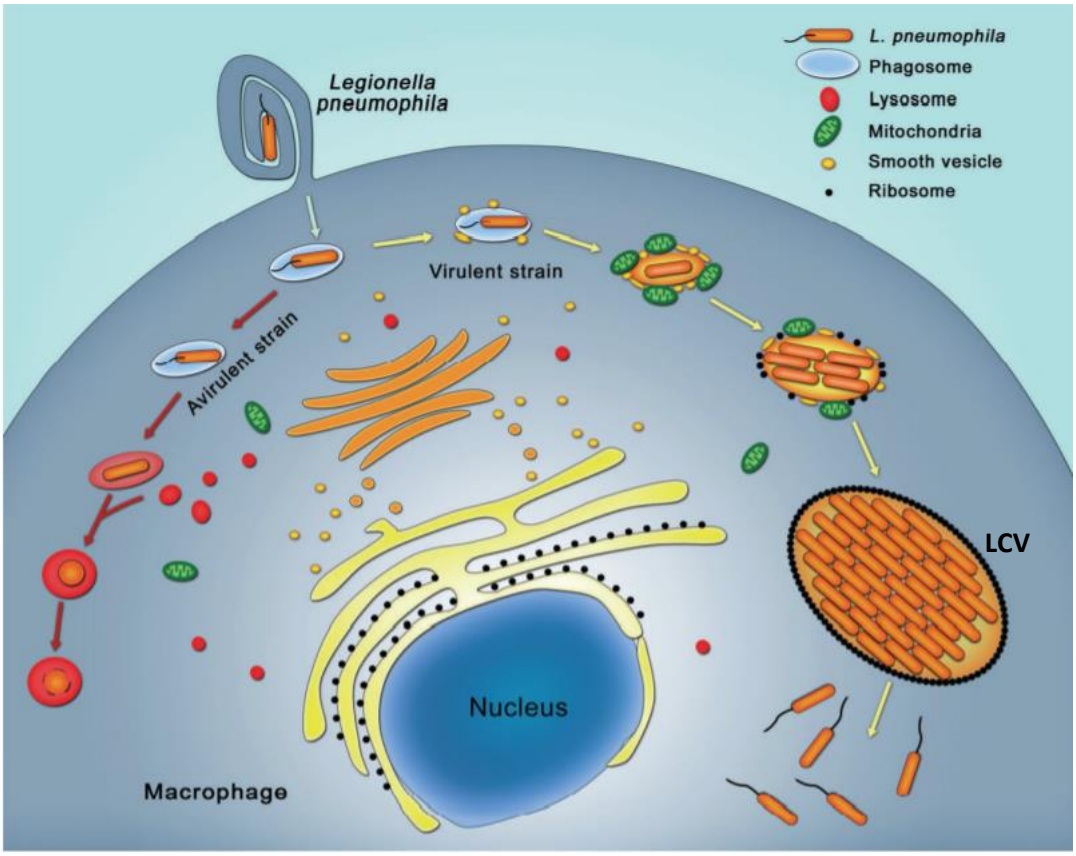
Περιστασιακά συμβαίνουν μεγάλες επιδημίες που σχετίζονται με πύργους ψύξης. Για παράδειγμα, στην Ισπανία (449 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις, 2001), στην Πορτογαλία (377 περιπτώσεις, 2014), στο Μπρόνξ της Νέας Υόρκης (138 κρούσματα, 2015) και στο Ντουμπάι (51 επιβεβαιωμένα κρούσματα, 2016-2017) [7][8].

Περίπου το 10%–15% όλων των αναφερόμενων περιπτώσεων της νόσου των Λεγεωνάριων συμβαίνουν σε άτομα που έχουν ταξιδέψει κατά τη διάρκεια των 10 ημερών πριν από την έναρξη των συμπτωμάτων [9].

1.2 Κύκλος ζωής βακτηρίου

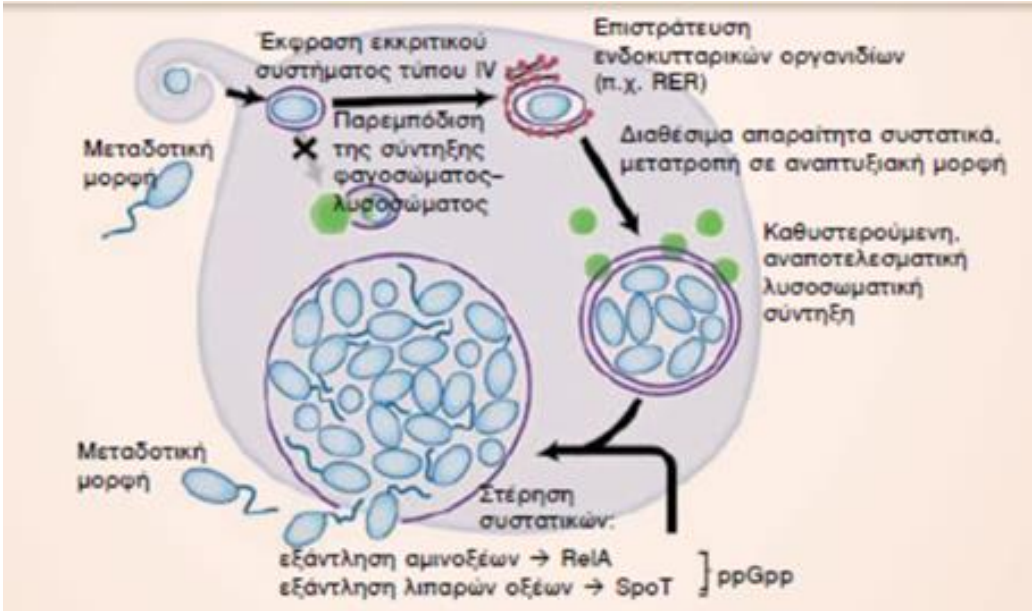
Αντίθετα από τους υπόλοιπους οργανισμούς, η *Legionella* δε θανατώνεται από την φαγοκυττάρωση, αλλά αναπτύσσεται και πολλαπλασιάζεται μέσα στο κύτταρο-ξενιστή, μέσω μηχανισμών που έχει αναπτύξει μέσω της συμβίωσης της με ευκαρυωτικούς οργανισμούς [10]. Έχει βρεθεί μάλιστα ότι μετά την προσβολή ενός ευκαρυωτικού οργανισμού, η *Legionella* καταφέρνει να χρησιμοποιήσει προς όφελός της διαδικασίες όπως η μεταγραφή και η μετάφραση, προκειμένου να εκφράσει πρωτεΐνες για τον πολλαπλασιασμό της. Οι μηχανισμοί αυτοί της επιτρέπουν να προσβάλλει και τα μακροφάγα κύτταρα του ανθρώπου, όπου μπορεί να εξελιχθεί στη νόσο των λεγεωνάριων, μία σοβαρή και άτυπη πνευμονία [11].

Η *Legionella* προσβάλει τα ανθρώπινα μακροφάγα, τα οποία είναι φαγοκύτταρα και αποτελούν άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού. Η διαδικασία αυτή φαίνεται στην Εικόνα 1. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, έχουν τη δυνατότητα να θανατώνουν τους μικροοργανισμούς που προσβάλουν τον ανθρώπινο οργανισμό [12][13]. Όμως, η *Legionella* έχει τη δυνατότητα, όχι μόνο να αποφεύγει την θανάτωση, αλλά να αναπτύσσεται και να πολλαπλασιάζεται μέσα σε αυτά. Με τη βοήθεια των πρωτεϊνών-τελεστών που μεταφέρει στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή, μέσω του Εκκριτικού Συστήματος IVB, επεμβαίνει σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια για δικό της όφελος, όπως η κίνηση διάφορων κυστιδίων, η ουβικιτινιλίωση, η έκφραση γονιδίων και ο μεταβολισμός λιπιδίων [14][15][16].



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση των διάφορων σταδίων του κύκλου ζωής του βακτηρίου Legionella pneumophila μόλις προσβάλει το κύτταρο-ξενιστή [17].

Το βακτήριο εμφανίζεται σε δύο μορφές, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. Η μία μορφή είναι η αναπτυξιακή ή αναδιπλασιαζόμενη (replicative form) και εμφανίζεται όταν το βακτήριο έχει μολύνει ένα κύτταρο στο οποίο υπάρχει αρκετό θρεπτικό υλικό (κυρίως αμινοξέα) για την ανάπτυξή του. Η άλλη μορφή είναι η μεταδοτική (transmissible form) και εμφανίζεται εφόσον τελειώσουν τα θρεπτικά συστατικά και το βακτήριο πρέπει να βρει αλλού θρεπτικό υλικό [18][19].



Εικόνα 2. Βασικά γεγονότα που συμβαίνουν στον κύκλο ζωής της Legionella pneumophila. Φαίνεται η μεταδοτική φάση (με το μαστίγιο) και η αναπτυξιακή φάση (χωρίς το μαστίγιο, μέσα στο LCV) [20].

1.2.1 Αναπτυξιακή μορφή

Η αναπτυξιακή μορφή ξεκινά με την φαγοκυττάρωση. Με την εισαγωγή της *Legionella* μέσα στο μακροφάγο, με τη βοήθεια του εκκριτικού συστήματος τύπου IV, μεταφέρει μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών (πάνω από 300), οι οποίες συντελούν διάφορες λειτουργίες που έχουν σκοπό να επιτρέψουν στο βακτήριο να επιβιώσει και να αναπτυχθεί. Οι πρωτεΐνες αυτές επιφέρουν αλλαγές σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια, τα οποία συντελούν στην εγκαθίδρυση ενός ενδοσώματος μέσα στο οποίο θα αναπτυχθεί και θα πολλαπλασιαστεί η *Legionella*. Το ενδόσωμα αυτό ονομάζεται *Legionella*-Containing Vacuole (LCV) [14][21]. Ακόμη, επηρεάζουν την κίνηση των διάφορων κυστιδίων ανάμεσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και το δίκτυο Golgi. Το LCV συσχετίζεται με το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και στρατολογεί μεγάλο αριθμό ριβοσωμάτων, τα οποία «εγκαθίστανται» πάνω στην εξωτερική μεμβράνη του και χρησιμοποιούνται προς όφελος του βακτηρίου [22]. Τέλος, επηρεάζουν το μεταβολικό μονοπάτι της ουβικιτινιλίωσης για να συμβάλει στη δική του επιβίωση, παρόλο που οι προκαρυωτικοί οργανισμοί δεν διαθέτουν τέτοιο μηχανισμό. Χρησιμοποιώντας αυτούς τους μηχανισμούς, το βακτήριο καταφέρνει να δημιουργήσει ιδανικές για αυτό συνθήκες μέσα στο LCV, στο οποίο πολλαπλασιάζεται έως ότου το μακροφάγο κυριολεκτικά να «γεμίσει» από βακτήρια και να τελειώσουν τα θρεπτικά συστατικά [23].

1.2.2 Μεταδοτική μορφή

Εφόσον το βακτήριο δεν έχει πλέον τροφή, σταματά να πολλαπλασιάζεται και περνά στην μεταβατική του μορφή. Στη μορφή αυτή, το βακτήριο εκφράζει παράγοντες που λύουν τις ευκαρυωτικές μεμβράνες, με αποτέλεσμα να μπορεί να εξέλθει από το μακροφάγο. Οι απόγονοι, μόλις απελευθερωθούν από το κύτταρο-ξενιστή, εμφανίζουν μαστίγιο, το οποίο θα τους βοηθήσει στην κίνηση μέχρι να προσβάλλουν άλλο κύτταρο. Ακόμη, το βακτήριο στη μεταδοτική του μορφή εκφράζει διάφορες πρωτεΐνες που το καθιστούν ανθεκτικότερο [24]. Μόλις εισέλθει στο επόμενο κύτταρο-ξενιστή, αρχικά, μέσω του εκκριτικού του συστήματος, μεταφέρει πρωτεΐνες για να καταφέρνει να αποτρέψει τη σύντηξη του φαγοσώματος στο οποίο βρίσκεται με το λυσόσωμα. Αυτό θα είχε ως αποτέλεσμα την ραγδαία πτώση του pH και την εισβολή πρωτεολυτικών ενζύμων στο κυστίδιο αυτό και τελικά τον κυτταρικό της θάνατο, όπως γίνεται σε κάθε άλλη περίπτωση φαγοκυττάρωσης [25].

Συγκεκριμένα, μεταφέρει αρκετές πρωτεΐνες, οι οποίες στοχεύουν την Rab1, μία GTPάση του κυττάρου-ξενιστή η οποία είναι υπεύθυνη για την μετακίνηση κυστιδίων στο εκκριτικό μονοπάτι των ευκαρυωτικών κυττάρων. Για τα θηλαστικά, η Rab1 ρυθμίζει την κίνηση κυστιδίων που συμπεριλαμβάνονται στη διαδικασία της αυτοφαγίας, την κίνηση των κυστιδίων από το ενδοπλασματικό δίκτυο μέχρι το σύμπλεγμα Golgi και την κίνησή τους μέσα στο σύμπλεγμα Golgi. Ακόμα, μεταφέρει την MavN, μία πρωτεΐνη καίριας σημασίας για την τροφοδοσία του LCV με σίδηρο, που όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι βασικό στοιχείο για την επιβίωση και ανάπτυξη της *Legionella*. Μετά την αποφυγή της σύντηξης φαγοσώματος-λυσοσώματος, το βακτήριο περνά ξανά στην αναπτυξιακή του μορφή [26].

1.3 Παθογένεια

Παρά την παρουσία της *Legionella* σε πολλά υδρόβια περιβάλλοντα, ο κίνδυνος εμφάνισης νόσου των Λεγεωνάριων για τους περισσότερους ανθρώπους είναι χαμηλός. Άτομα ηλικίας άνω των 50 ετών, τρέχοντες ή πρώην καπνιστές, έχουν χρόνιες πνευμονικές καταστάσεις ή βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή, διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης όταν εκτίθενται σε μικροσταγονίδια που περιέχουν *Legionella* [27].

Η *Legionella* τις περισσότερες φορές προσβάλει τον άνθρωπο, λόγω μόλυνσης και αποικισμού υδραυλικών συστημάτων. Συνήθως, για την νόσο στον άνθρωπο, ευθύνονται σιντριβάνια, πύργοι ψύξης, κλιματιστικά και ντουζιέρες τα οποία παράγουν

μολυσμένα αεροζόλ και μικροσταγονίδια. Μάλιστα, όσο μικρότερα είναι τα μολυσμένα μικροσταγονίδια, τόσο πιο επικίνδυνο είναι να προκαλέσουν νόσο σε όποιον τα εισπνεύσει [28].

Η μόλυνση των ανθρώπινων μακροφάγων γίνεται μονάχα από την αναπνευστική οδό. Το βακτήριο δεν μεταδίδεται από άτομο σε άτομο, παρά μόνο από περιβαλλοντική πηγή. Παρόλο που όλα τα είδη είναι ενδεχομένως παθογόνα, η *Legionella pneumophila* ορότυπου 1 είναι αυτή που κυρίως (95% των περιπτώσεων) προκαλεί νόσο στον άνθρωπο. Άλλα είδη που απομονώνονται συχνά από ασθενείς είναι *Legionella micdadei, Legionella bozemanae, Legionella dumoffii,* and *Legionella longbeachae*. Η μόλυνση με *Legionella* μπορεί να προκαλέσει είτε τη νόσο των Λεγεωνάριων, είτε τον πυρετό Pontiac [6][29][30].

1.3.1 Νόσος των Λεγεωνάριων (Legionnaires' Disease)

Η νόσος των Λεγεωνάριων είναι μια οξεία βακτηριακή πνευμονία με ταχεία έναρξη ανορεξίας, αδιαθεσίας, μυαλγίας, κεφαλαλγίας και ταχέως αυξανόμενου πυρετού, προχωρώντας σε πνευμονία, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αναπνευστική ανεπάρκεια και θάνατο.

Η νόσος των Λεγεωνάριων είναι μία άτυπη πνευμονία κατά την οποία γίνεται κατάληψη των πνευμονικών κυψελίδων και των τελικών βρογχιολίων από φλεγμονώδες εξίδρωμα. Αρχικά, εμφανίζεται σαν γρίπη κι έπειτα αποκτά κλινικά χαρακτηριστικά πνευμονίας. Σε πρώτο στάδιο, εμφανίζεται πυρετός και αδυναμία. Ακόμη, στις μισές περίπου περιπτώσεις εμφανίζονται γαστρεντερικές διαταραχές, όπως ναυτία, έμετοι, επιγαστρικό άλγος και διάρροια [31][32].

Έπειτα, στην οξεία φάση, εμφανίζεται πολύ υψηλός πυρετός (40° – 41° C) και αρχίζουν να εμφανίζονται σημάδια πνευμονίας, όπως βήχας, δύσπνοια και θωρακικό άλγος. Οι ασθενείς παρ' όλα αυτά δεν παράγουν πυώδη έγχρωμα πτύελα όπως οι συνηθισμένες βακτηριακές βρογχοπνευμονίες. Μερικές φορές παρατηρείται ρίγος και πονοκέφαλος και σε κάποιες περιπτώσεις πλευρίτιδα και αναπνευστική ανεπάρκεια. Ακόμη, πιθανό είναι να προκληθεί νοητική σύγχυση και λήθαργος λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου στο αίμα και τέλος, μπορεί να παρατηρηθεί δυσλειτουργία των νεφρών και του ήπατος[33][34].

Το πλείστον των περιπτώσεων οφείλεται στην *Legionella pneumophila* ορότυπου 1 (*Lp*1). Ο χρόνος επώασης της νόσου είναι 2-10 ημέρες (σπάνια, έως και 19 ημέρες). Συνήθως απαιτεί νοσηλεία και το ποσοστό θνητότητας είναι περίπου 10% των

περιπτώσεων. Στις ειδικές περιπτώσεις των ανοσοκατασταλμένων ασθενών το ποσοστό αυτό αγγίζει το 25% [35][36].

1.3.2 Πυρετός Pontiac (Pontiac Fever)

Ο πυρετός Pontiac μπορεί να οφείλεται σε αρκετά είδη του βακτηρίου *Legionella*. Αποτελεί μία ήπια μορφή της νόσου, η οποία είναι αυτοπεριοριζόμενη. Μοιάζει με κοινό κρυολόγημα με πυρετό (38° – 39° C) και προσβάλει μεγάλο αριθμό ατόμων. Εκτός από πυρετό, εμφανίζει πονοκέφαλο, ζαλάδα και μυαλγίες. Ο χρόνος επώασης είναι 36-48 ώρες. Όλοι οι ασθενείς αναρρώνουν πλήρως και χωρίς επιπλοκές σε 2-5 ημέρες. Ο πυρετός Pontiac έχει μηδενικό ποσοστό θνητότητας [37].

1.4 Διάγνωση

Χρησιμοποιούνται αρκετές μέθοδοι για τη διάγνωση της νόσου από *Legionella*. Η πιο αξιόπιστη (ανίχνευση όλων των οροτύπων και στελεχών) είναι η απομόνωση του μικροοργανισμού από τις εκκρίσεις του κατώτερου αναπνευστικού και η καλλιέργειά του σε ειδικό θρεπτικό υλικό στο εργαστήριο. Όμως, αυτή η μέθοδος απαιτεί ικανή ποσότητα βακτηρίων η οποία συνήθως δε βρίσκεται στα πτύελα. Επίσης, απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα, δηλαδή 3-5 ημέρες επώασης έως ότου εμφανιστούν αποικίες [38].

Πιο γρήγορες, αλλά όχι τόσο ευαίσθητες και ειδικές μέθοδοι είναι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός σε ορό του ασθενή, ο άμεσος ανοσοφθορισμός δείγματος πτυέλων και η ανίχνευση ελεύθερου αντιγόνου του ορότυπου 1 της *Legionella pneumophila* (Lp1) σε δείγμα ούρων μέσω ανοσοχρωματογραφίας (urinary test), που όμως δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση άλλων οροτύπων και άλλων στελεχών [39]. Τέλος, η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται επιτυχώς σε δείγματα ούρων και βρογχικών εκπλυμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι συνήθως η διάγνωση γίνεται με συνδυασμό 2 (ή παραπάνω) διαγνωστικών τεχνικών [40][41].

1.5 Θεραπεία

Πολύ σημαντικό βήμα για την καταπολέμηση της νόσου των Λεγεωνάριων, είναι η έγκαιρη διάγνωση, μιας και απαιτείται ειδική αγωγή για την επιτυχή αντιμετώπιση της νόσου [42]. Στο 75% των περιπτώσεων που καταλήγουν, δεν έγινε έγκαιρη

διάγνωση, με αποτέλεσμα να μην ξεκινήσει άμεσα η κατάλληλη αγωγή του ασθενή. Σε σοβαρές περιπτώσεις, οι ασθενείς μπορεί να χρειαστεί να παραμείνουν αρκετό καιρό σε μονάδες εντατικής θεραπείας [43].

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της νόσου των Λεγεωνάριων είναι οι μακρολίδες και οι φθοροκινολόνες. Οι μακρολίδες (αζιθρομυκίνη ή κλαριθρομυκίνη) ή φθοροκινολόνες (λεβοφλοξασίνη ή μοξιφλοξασίνη) είναι η τυπική θεραπεία που χρησιμοποιείται επί του παρόντος. Ο πυρετός Pontiac είναι μια αυτοπεριοριζόμενη ασθένεια που απαιτεί μόνο υποστηρικτική φροντίδα και δεν χρειάζεται θεραπεία [44][45][46][47].

1.6 Ανοσολογική απόκριση - Αντιγόνα

Αντιγόνα ονομάζονται οι ουσίες οι οποίες προκαλούν ανοσολογική απόκριση, δηλαδή αναγνωρίζονται από τα Β κύτταρα ή τα Τ κύτταρα, σε συνδυασμό με τα μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatability Complex, MHC). Πρακτικά, αντιγόνα ονομάζονται οι ουσίες που προκαλούν την παραγωγή αντισωμάτων ειδικά για αυτά, ωστόσο προκαλούν επίσης ανοσολογικές αποκρίσεις που προκαλούνται από Τ κύτταρα και μπορεί να οδηγήσουν σε φλεγμονώδη απόκριση. Το ανοσοποιητικό σύστημα θα προσπαθήσει να καταστρέψει ή να εξουδετερώσει οποιοδήποτε αντιγόνο που αναγνωρίζεται ως ξένος και δυνητικά επιβλαβής εισβολέας [48].

Σε μοριακό επίπεδο, ένα αντιγόνο χαρακτηρίζεται από την ικανότητά του να «δεσμεύεται» στη θέση αναγνώρισης του από ένα αντισώμα. Τα αντισώματα τείνουν να κάνουν διάκριση μεταξύ των ειδικών μοριακών δομών που παρουσιάζονται στην επιφάνεια του αντιγόνου. Τα αντιγόνα είναι συνήθως πρωτεΐνες, πεπτίδια ή πολυσακχαρίτες. Ως αντιγόνα μπορούν να λειτουργήσουν διάφορα μέρη (κυτταρικά τοιχώματα, μαστίγια, ίνες, τοξίνες κ.ά.) βακτηρίων, ιών κι άλλων μικροοργανισμών. Τα λιπίδια και τα νουκλεϊκά οξέα είναι αντιγονικά μόνο όταν συνδυάζονται με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες.

Τα αντιγόνα έχουν ανοσολογικά ενεργές περιοχές, που μπορούν να δεσμεύονται από διαφορετικά αντισώματα. Κάθε μία από αυτές τις περιοχές ονομάζεται επίτοπος. Τα αντιγόνα έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύονται από διαφορετικά αντισώματα, καθένα από τα οποία είναι ειδικό για ένα συγκεκριμένο επίτοπο. Ένας επίτοπος ενός

πρωτεϊνικού αντιγόνου μπορεί να περιέχει στοιχεία της πρωτοταγούς, της δευτεροταγούς, της τριτοταγούς ή ακόμη και της τεταρτοταγούς δομής [49].

Τα πρωτεΐνικά αντιγόνα είναι εξαιρετικής σημασίας στην ανοσολογική απόκριση. Είναι πρωτεΐνες τις οποίες «στοχεύει» ο οργανισμός προκειμένου να δημιουργήσει αντισώματα για την καταπολέμηση του εισβολέα. Αποτελούν (μαζί με τους πολυσακχαρίτες) τα σημαντικότερα ανοσογόνα. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται ως στόχοι για την δημιουργία διαγνωστικών τεστ, αλλά και εμβολίων.

1.7 Σκοπός Εργασίας

Η συγκεκριμένη εργασία έχει στόχο την μελέτη αντιγονικών πρωτεϊνών *της Legionella pneumophila*, με σκοπό να βρεθούν κατάλληλες αντιγονικές πρωτεΐνες οι οποίες να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν στην ανάπτυξη γρήγορου και αξιόπιστου διαγνωστικού τεστ. Αυτό θα δώσει την δυνατότητα της έγκαιρης διάγνωσης της νόσου και της άμεσης ιατρικής αγωγής.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Καλλιέργεια της *Legionella pneumophila*

Για την καλλιέργεια και απομόνωση της *Legionella pneumophila*, αρχικά γίνεται καλλιέργεια σε τρυβλίο (στερεή καλλιέργεια) κι έπειτα γίνεται εμβολιασμός σε υγρή καλλιέργεια.

2.1.1 Στερεή καλλιέργεια

Όλα τα βακτήρια *Legionella* φυλάσσονται σε 20% Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid CM1135), στους -80° C. Μία μοναδική αποικία από κάθε δείγμα (περιβαλλοντικό ή απομονωμένο από ασθενή) επαναιωρείται σε 20% BHI και φυλάσσεται στους -80° C μέχρις ότου χρησιμοποιηθεί (bacterial stock).

Μικρή ποσότητα από το bacterial stock απλώνεται σε τρυβλίο Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE-α growth supplement, VWR CHEMICALS) και επωάζεται στους 36°C για 2 ημέρες.

2.1.2 Υγρή καλλιέργεια

Για την υγρή καλλιέργεια (25 ml καλλιέργειας σε κάθε Falcon των 50 ml), αναμειγνύεται κατάλληλος όγκος του BCYE α-growth supplement (2,5 ml για 25 ml καλλιέργειας) με το yeast extract (22,5 ml για 25 ml καλλιέργειας). Όλα τα υλικά είναι αποστειρωμένα και όλες οι διαδικασίες γίνονται σε στείρες συνθήκες. Επιλέγεται μια μοναδική αποικία από τα τρυβλία που έχουν επωαστεί στους 36°C για 2 ημέρες, με την οποία εμβολιάζεται η υγρή καλλιέργεια. Η καλλιέργεια αναδεύεται (180 rpm), στους 36°C, για 1 ημέρα.

2.2 Λύση κυττάρων με ωσμωτικό σοκ

Για την λύση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο [50]. Τα κύτταρα από 50 ml καλλιέργειας συλλέγονται μέσω φυγοκέντρισης (Jouan GR4.12) στα 6,000 x *g*, 20 λεπτά, 4°C. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 20 ml υπέρτονου ρυθμιστικού διαλύματος σακχαρόζης (1 M Sucrose, 150 mM Tris/HCl, pH=7.5, 1 mM EDTA). Το δείγμα αφήνεται στον πάγο για 10 λεπτά και στην συνέχεια φυγοκεντρείται (Beckman Centrifuge J-21) στα 15,000 x *g* για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται στην μικρή ποσότητα διαλύματος που έχει απομείνει. Το δείγμα αφήνεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά,

προστίθενται γρήγορα 20 ml παγωμένου απιονισμένου νερού, γίνεται αμέσως καλή ανάδευση και το δείγμα αφήνεται στον πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 10 mM $MgCl_2$ και DNaseI και το δείγμα αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Μετά το πέρας των 15 λεπτών, προστίθενται Tris/HCl, pH=7.5 και EDTA έτσι ώστε οι τελικές συγκεντρώσεις στο διάλυμα να είναι αντίστοιχα 150 mM και 20 mM. Το δείγμα φυγοκεντρείται στα 15,000 x g για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 20ml παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος TE (10 mM Tris/HCl, pH=7.5, 1 mM EDTA). Το δείγμα φυγοκεντρείται πάλι στα 15,000 x *g* για 30 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Το ίζημα επαναιωρείται σε 1 ml παγωμένου ρυθμιστικού TE και φυλάσσεται στους -20°C. Το ίζημα αποτελείται από τις μεμβράνες των βακτηρίων.

2.3 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης (BCA)

Για τον προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης χρησιμοποιείται η μέθοδος Bicinchoninic Acid Assay (BCA assay kit, Pierce™ BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific). Για κάθε μέτρηση, κατασκευάζεται η αντίστοιχη πρότυπη καμπύλη αναφοράς (1-10 μl από πρότυπη 1 mg/ml BSA και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 10 μl με το αντίστοιχο διάλυμα του κάθε δείγματος). Το διάλυμα BCA φτιάχνεται αναμειγνύοντας τα αντιδραστήρια A (Bicinchoninic Acid, Sodium Carbonate, Sodium Tartrate, and Sodium Bicarbonate, pH=11.25) και B (4% $CuSO_4x5H_2O$) σε αναλογία 50:1. Για τα άγνωστα δείγματα γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις (αν χρειάζεται) και τοποθετούνται 10 μl σε κάθε πηγαδάκι. Σε όλα τα πηγαδάκια με πρωτεϊνικό δείγμα (είτε πρότυπης καμπύλης είτε άγνωστο) προστίθενται 200 μl διαλύματος BCA. Όλες οι μετρήσεις γίνονται σε διπλέτες. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιούνται 96-well plates (Nunc). Τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 30 λεπτά στο σκοτάδι. Η απορρόφηση μετράται στα 562 nm (Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer).

2.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Η αντιγονικότητα των μεμβρανών της *Legionella pneumophila* και των ορών από άτομα που προσβλήθηκαν από *Legionella pneumophila* μελετώνται αρχικά με direct ELISA [51][52]. Μεμβράνες (που προετοιμάζονται με ωσμωτικό σοκ) χρησιμοποιούνται ως αντιγόνα, για να «καλύψουν» την επιφάνεια των πηγαδιών των microtiter flat-

bottom 96-well plates που χρησιμοποιούνται. Τα πρωτεϊνικά δείγματα αραιώνονται σε coating buffer (0,05 M Sodium carbonate/bicarbonate, pH=9,6) σε τελική συγκέντρωση 20 μg/ml. Για να γίνει η επικάλυψη των πηγαδιών με το αντιγόνο, 100 μl του πρωτεϊνικού δείγματος προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι. Το plate καλύπτεται με parafilm και αφήνεται να επωαστεί 16-18 ώρες στους 4°C. Μετά την επώαση, το διάλυμα απομακρύνεται και τα πηγαδάκια πλένονται 3 φορές με 200 μl ανά πηγαδάκι Washing buffer (Phosphate-buffered saline (PBS), 0,05% Tween 20). Μετά τις πλύσεις, 100 μl από τον κάθε ορό (1:100 αραιωμένο) σε Blocking buffer (PBS, 0,05% Tween 20, 1% Bovine Serum Albumin) προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι και γίνεται επώαση του plate για 60 λεπτά στους 37°C. Μετά την επώαση, οι οροί απομακρύνονται και τα πηγαδάκια πλένονται τρεις φορές όπως πριν. Έπειτα, σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται 100 μl δευτεροταγούς αντισώματος, rabbit anti-human IgG antibody peroxidase-conjugated (BosterBio) (1:3000 αραιωμένο) και επωάζονται για 30 λεπτά στους 37°C. Τα πηγαδάκια πλένονται ξανά όπως πριν. Προστίθενται 100 μl TMB και γίνεται επώαση για 8 λεπτά σε σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση τερματίζεται προσθέτοντας 100 μl 0,5 M H_2SO_4. Η απορρόφηση μετράται στα 450 nm (Multiskan™ FC Microplate Photometer).

2.5 Μονοδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Όλα τα πρωτεϊνικά δείγματα αναμειγνύονται με 4X sample buffer (NuPAGE™ LDS Sample Buffer (106 mM Tris HCl, 141 mM Tris Base, 2% LDS, 10% Glycerol, 0,51 mM EDTA, 0,22 mM SERVA Blue G250, 0,175 mM Phenol Red, pH 8.5), Invitrogen) και επωάζονται για 30 λεπτά στους 42°C πριν την ηλεκτροφόρηση. Σε κάθε πηγαδάκι προστίθενται περίπου ~10 μg πρωτεϊνικού δείγματος. Χρησιμοποιούνται πηκτές με 10, 12, 17 και 26 πηγαδάκια (12% Bis-Tris gels, Invitrogen). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε συσκευή XCell SureLock™ Electrophoresis Cell device (Invitrogen), με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης MOPS (50 mM MOPS, 50 mM Tris base, 0,1% SDS, 1 mM EDTA) ή ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης MES (50 mM MES, 50 mM Tris base, 0,1% SDS, 1 mM EDTA), στα 200 V για 50 λεπτά στους 4°C. Οι πηκτές βάφονται με διάλυμα 0,1% (w/v) Coomassie Blue G-250, 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Acetic Acid για 16-18 ώρες. Για τον αποχρωματισμό τους, επωάζονται σε διάλυμα αποχρωματισμού (40% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Acetic Acid), έως ότου αποχρωματιστούν ικανοποιητικά.

2.6 Δυσδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου 2DE (IEF/SDS)

Η ηλεκτροφόρηση πρώτης διάστασης γίνεται με ισοηλεκτρική εστίαση. Πρωτεϊνικό δείγμα (100-1000 μg) διαλυτοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα ενυδάτωσης (8 M Urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% ampholytes 3-10, 0,001% Bromophenol Blue). Για την ισοηλεκτρική εστίαση χρησιμοποιούνται τα ReadyStrip IPG Strips 7 cm, pH 3-10 NL (Bio-Rad). Τα strips επωάζονται για 16-18 ώρες, στους 20°C, με 125 μl ρυθμιστικού διαλύματος ενυδάτωσης στο οποίο έχει προστεθεί το πρωτεϊνικό δείγμα. Η ισοηλεκτρική εστίαση πραγματοποιείται σε συσκευή Protein IEF Cell System (Bio-Rad), με τα εξής στάδια: 1) 250 V με γρήγορη αύξηση για 15 λεπτά, 2) 4.000 V με γραμμική αύξηση για 1 ώρα και τέλος, 3) 4.000 V με γρήγορη αύξηση για 5 ώρες (συνολικά ~16000 Vhrs). Στη συνέχεια, η λωρίδα επωάζεται για 15 λεπτά με equilibration buffer I (6 M Urea, 2% SDS, 375 mM Tris/HCl, pH= 8,8, 20% (v/v) Glycerol, 130 mM DTT) και άλλα 15 λεπτά με equilibration buffer II (6 M Urea, 2% SDS, 375 mM Tris/HCl, pH= 8,8, 20% (v/v) Glycerol, 135 mM Iodoacetamide).

Μετά την ηλεκτροφόρηση πρώτης διάστασης, το strip τοποθετείται πάνω στην πηκτή δεύτερης διάστασης. Η ηλεκτροφόρηση δεύτερης διάστασης γίνεται με πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% και ηλεκτροφόρηση στα 20 mA/πηκτή για 2 περίπου ώρες.

2.7 Ανοσοαποτύπωμα (Western Blot)

Μετά την ηλεκτροφόρηση, μία πηκτή χρησιμοποιείται για την παρατήρηση των πρωτεϊνών με Coomassie Blue G-250 και μία άλλη χρησιμοποιείται για ανοσοαποτύπωμα. Η μεταφορά των πρωτεϊνών (blotting) γίνεται με την συσκευή iBlot™ device (Invitrogen) χρησιμοποιώντας iBlot Gel Transfer Stacks PVDF (Regular and Mini, Invitrogen). Το blotting γίνεται για 6 λεπτά. Ακολουθεί επώαση της PVDF μεμβράνης σε 2% BSA σε TBST buffer (10 mM Tris/HCl pH=8, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) για 60 λεπτά, προκειμένου να καλυφθούν οι μη-ειδικές θέσεις. Μετά την επώαση γίνονται τρεις πλύσεις με TBST buffer (5 λεπτά η κάθε πλύση). Μετά τις πλύσεις, γίνεται επώαση της μεμβράνης με το πρωτοταγές αντίσωμα σε TBST (ορός ασθενούς (1:500) ή anti-His antibody Alkaline phosphatase conjugated (Invitrogen) (1:2000)) για 60 λεπτά. Μετά την επώαση γίνονται ξανά τρεις πλύσεις με TBST όπως πριν. Η μεμβράνη επωάζεται, εάν χρειάζεται, με δευτεροταγές αντίσωμα σε TBST

(anti-human IgG antibody, Alkaline phosphatase conjugated (Invitrogen) (1:1000)) για 60 λεπτά. Γίνονται ξανά τρεις πλύσεις με TBST όπως πριν κι ακολούθως γίνονται άλλες τρεις πλύσεις (5 λεπτά η καθεμία) με AP buffer (100 mM Tris/HCl pH=9,5, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$). Το ανοσοαποτύπωμα εμφανίζεται με 250 μg/ml BCIP και 500 μg/ml NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate / nitro blue tetrazolium). Εναλλακτικά η μεταφορά των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει σε μεμβράνη PVDF με semi-dry σύστημα μεταφοράς. Η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος κατά την διάρκεια της μεταφοράς είναι 1,2 mA/cm^2 και η μεταφορά διαρκεί μιάμιση ώρα. Τα υπόλοιπα βήματα είναι όπως περιεγράφηκαν προηγουμένως.

2.8 Φασματομετρία μάζας (Mass spectrometry)

Χρησιμοποιώντας τα μοτίβα από τα Western Blots, κόβονται λωρίδες από πηκτές SDS-PAGE, στα μοριακά βάρη όπου υπάρχουν πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με τους ορούς των ασθενών και η ταυτοποίηση τους έγινε με nLC-ESI-MS/MS. Τα δεδομένα από το nano LC MS/MS αναλύθηκαν με το λογισμικό Proteome Discoverer (ThermoFisher) και τα φάσματα αντιστοιχηθήκαν με την βάση δεδομένων του γονιδιώματος της *Legionella pneumophila serogroup 1*.

2.9 Κλωνοποίηση πρωτεϊνών

Η κλωνοποίηση των επιθυμητών γονιδίων γίνονται σε δύο στάδια. Αρχικά, γίνεται κλωνοποίηση σε πλασμίδιο pMini προκειμένου να ελεγχθεί η ακολουθία των νουκλεοτιδίων των προϊόντων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης PCR κι έπειτα γίνεται κλωνοποίηση στο τελικό πλασμίδιο pET22b(+).

2.9.1 Απομόνωση γενωμικού DNA από την *Legionella pneumophila*

Προκειμένου να απομονωθεί το γενωμικό DNA (gDNA) της *Legionella pneumophila serogroup 1*, χρησιμοποιείται το PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) και ακολουθούνται οι οδηγίες του κατασκευαστή. Για την απομόνωση χρησιμοποιείται στέλεχος (Lp1 1204) το οποίο καλλιεργείται σε τρυβλίο BCYE για 1 ημέρα, στους 36°C.

2.9.2 Σχεδιασμός εκκινητών (primers)

Για τον σχεδιασμό των κατάλληλων ζευγών εκκινητών (Forward και Reverse) χρησιμοποιείται το πρόγραμμα Clone Manager, έτσι ώστε να πολλαπλασιαστούν οι επιθυμητές αλληλουχίες. Οι επιθυμητές αλληλουχίες αποτελούνται από τα γονίδια-στόχους μαζί με 200-300 βάσεις πριν και άλλες τόσες περίπου βάσεις μετά από το κάθε γονίδιο. Προτιμάται όσο το δυνατόν τα ζεύγη εκκινητών να έχουν παρόμοιο μήκος (συνήθως 18-25 ζεύγη βάσεων), να έχουν ποσοστό G/C 40-60%, να αρχίζουν ή/και να τελειώνουν με G ή C, να μην έχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες μεταξύ τους και φυσικά να έχουν παρόμοιες τιμές Tm (melting temperature) (η μέγιστη διαφορά τιμών Tm να είναι έως 10°C).

2.9.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Για την κάθε αντίδραση PCR (τελικός όγκος 50 μl), χρησιμοποιείται gDNA (συνολικά 200-300 ng) της *Legionella pneumophila* serogroup 1 ή pDNA (1-10 ng) ως template, 0,5 μM από τον κάθε εκκινητή (Forward και Reverse) και το Phusion-GC-MasterMix. Το MasterMix αποτελείται από 1X GC-buffer (περιέχει 1,5 mM $MgCl_2$) (Thermo Scientific), 200 μM dNTPs από το καθένα (Thermo Scientific), 3% DMSO και Phusion Polymerase (0,02 U/μl) (Thermo Scientific).

Τα στάδια της PCR που χρησιμοποιούνται είναι: 1) 98°C για 30 δευτερόλεπτα, 2) 98°C για 10 δευτερόλεπτα, 3) 55-72°C (αναλόγως το Tm των εκκινητών) για 30 δευτερόλεπτα, 4) 72°C για όσα δευτερόλεπτα χρειάζεται αναλόγως το μήκος της επιθυμητής ακολουθίας (15-30 δευτερόλεπτα ανά kb), 5) 72°C για 10 λεπτά και τέλος 6) 4°C μέχρις ότου η αντίδραση χρησιμοποιηθεί ή φυλαχθεί στους -20°C. Τα βήματα (3) και (4) επαναλαμβάνονται για 30 κύκλους πριν τα βήματα (5) και (6).

2.9.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Προκειμένου να ελεγχθεί το προϊόν της PCR, γίνεται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Κατάλληλος όγκος Loading Dye (0,25% (w/v) bromophenol blue, 0,25% (w/v) xylene cyanol, 0,15% (w/v) orange G, 15% Ficoll 400) (GelPilot, Qiagen) αναμειγνύεται καλά με την αντίδραση PCR πριν την ηλεκτροφόρηση. Η πηκτή αποτελείται από 1% w/v αγαρόζη σε TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH≈8,3). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 150 V για

30 περίπου λεπτά. Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή επωάζεται για 15-20 λεπτά σε διάλυμα 0,5 μg/ml βρωμιούχου αιθίδιου (Carl Roth) και παρατηρείται σε λάμπα UV.

2.9.5 Απομόνωση DNA από πηκτή αγαρόζης

Εφόσον το προϊόν της PCR φαίνεται να έχει το σωστό μέγεθος σε σύγκριση με τον Marker (GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific), χρησιμοποιείται καθαρό νυστέρι για να κοπεί η λωρίδα της πηκτής που περιέχει το επιθυμητό τμήμα DNA. Για να απομονωθεί το DNA χρησιμοποιείται το Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση του DNA (ng/μl) και η καθαρότητά του (λόγοι 260/280 και 260/230) μετρούνται με το Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer (Peqlab).

2.9.6 Εισαγωγή DNA σε πλασμίδιο pMini (Ligation)

Προκειμένου να εισαχθούν τα επιθυμητά τμήματα DNA σε πλασμίδιο (pMini) χρησιμοποιείται το NEB PCR Cloning Kit (New England BioLabs) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο λόγος του επιθυμητού τμήματος DNA ως προς το γραμμικό πλασμίδιο (insert to vector ratio) που χρησιμοποιείται είναι 3:1. Για τον υπολογισμό της απαιτούμενης ποσότητας (ng) από το επιθυμητό τμήμα DNA χρησιμοποιείται το online tool της NEB (NebioCalculator, NEB) [53].

2.9.7 Μετασχηματισμός (Transformation)

Μετά το ligation που έγινε η εισαγωγή του επιθυμητού τμήματος DNA στο πλασμίδιο, 2,5 μl από την αντίδραση χρησιμοποιούνται για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων (competent cells). Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται (50μl aliquots) είναι τα Turbo Competent *E. Coli* (New England BioLabs). Μόλις προστεθεί ποσότητα από την αντίδραση, τα κύτταρα επωάζονται σε πάγο για 30 λεπτά. Μετά την επώαση, γίνεται θερμικό σοκ (heat shock), στους 42°C, για 60 δευτερόλεπτα και αμέσως μετά τοποθετούνται σε πάγο για άλλα 10 λεπτά. Προστίθενται 450 μl προθερμασμένου (37°C) θρεπτικού υλικού SOC (0,5% (w/v) Yeast Extract, 2% (w/v) Tryptone, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glucose) και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για 90 λεπτά. Μετά, απλώνονται σε τρυβλίο LB (0,5% (w/v) Yeast Extract, 1% (w/v) Tryptone, 10 mM NaCl, 1,5% (w/v) Agar) με 50 μg/ml καρβενικιλλίνη και επωάζονται στους 37°C για 16-18 ώρες.

2.9.8 Απομόνωση πλασμιδίου

Μετά τον μετασχηματισμό, επιλέγονται μερικές αποικίες για απομόνωση του πλασμιδίου τους. Οι αποικίες που επιλέγονται καλλιεργούνται στους 37ºC, για 16-18 ώρες, με ανάδευση 220 rpm, σε LB medium (0,5% (w/v) Yeast Extract, 1% (w/v) Tryptone, 10 mM NaCl) με 100 μg/ml αμπικιλλίνη. Για απομόνωση high copy number πλασμιδίου γίνεται καλλιέργεια 5ml, ενώ για απομόνωση low copy number πλασμιδίου γίνεται καλλιέργεια 25 ml.

Για την απομόνωση των πλασμιδίων χρησιμοποιείται το QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την έκλουση του pDNA (από την κάθε spin-down column) χρησιμοποιούνται 35 μl nuclease-free water. Μετά την απομόνωση του pDNA, μετριέται στο Nanodrop η συγκέντρωση και η καθαρότητά του.

2.9.9 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Προκειμένου να γίνει έλεγχος εάν η αλληλουχία του πλασμιδίου είναι σωστή, δηλαδή αν έχει εισαχθεί το επιθυμητό τμήμα DNA, γίνεται πέψη με περιοριστικά ένζυμα κι ελέγχονται τα θραύσματα σε πηκτή αγαρόζης. Αρχικά, ελέγχεται με την βοήθεια του Clone Manager, ποιο ή ποια περιοριστικά ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πέψη του κάθε πλασμιδίου, αλλά και τί μήκους θραύσματα θα δημιουργηθούν εάν το πλασμίδιο είναι το σωστό. Για την πέψη χρησιμοποιούνται ~250 ng pDNA. Το κάθε ένζυμο, σύμφωνα με τον κατασκευαστή του, έχει και το κατάλληλο buffer στο οποίο έχει την βέλτιστη απόδοση. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την μελέτη είναι τα FastDigest XhoI, NdeI, HindIII (Thermo Scientific) και το 10X FastDigest Green Buffer (Thermo Scientific). Η πέψη πραγματοποιείται στους 37ºC, για 15-30 λεπτά.

2.9.10 Νουκλεοτιδική αλληλούχιση (Sequencing)

Τα πλασμίδια που μετά την πέψη με περιοριστικά ένζυμα δίνουν σωστό μοτίβο στην πηκτή αγαρόζης, στέλνονται (Eurofins) για νουκλεοτιδική αλληλούχιση. Για την αλληλούχιση, προστίθενται ~1000 ng pDNA σε κάθε αντίδραση αλληλούχισης. Για το κάθε πλασμίδιο γίνεται αλληλούχιση με δύο εκκινητές (Forward και Reverse). Μία αντίδραση με τον Forward εκκινητή και μία με τον Reverse. Τα αποτελέσματα της

αλληλούχισης συγκρίνονται με την επιθυμητή αλληλουχία (Ενότητα G στο Παράρτημα) με το online tool Multalin Sequence Alignment [54].

2.9.11 Εισαγωγή DNA σε πλασμίδιο pET22b(+)

Εφόσον το πλασμίδιο είναι σωστό και η ακριβής αλληλουχία του είναι πλέον γνωστή, σχεδιάζονται εκκινητές για In-Fusion κλωνοποίηση. Με την In-Fusion κλωνοποίηση, το τελικό αποτέλεσμα είναι η μεταφορά του επιθυμητού γονιδίου από το κωδικόνιο έναρξης μέχρι το κωδικόνιο λήξης στο τελικό πλασμίδιο (pET22b(+)).

Οι εκκινητές μπορούν να σχεδιαστούν είτε με την βοήθεια του online tool (Free Primer Design Tool – In-Fusion Cloning, Takara Bio) [55] είτε χειροκίνητα. Για να σχεδιαστούν οι In-Fusion εκκινητές, χρησιμοποιείται το Clone Manager για να σχεδιαστεί το τελικό προϊόν (pET22b(+)-γονίδιο). Από το τελικό προϊόν, 15 βάσεις από το backbone του πλασμιδίου χρησιμοποιούνται και άλλες 18-25 βάσεις από το γονίδιο (5'→3') για τον Forward εκκινητή (συνολικά 33-40 βάσεις). Αντίστοιχα, για τον Reverse εκκινητή (συνολικά 33-40 βάσεις), 15 βάσεις από το backbone του πλασμιδίου και άλλες 18-25 βάσεις από το γονίδιο (3'→5'). Για να βρεθεί η συμπληρωματική και αντιπαράλληλη αλληλουχία του Reverse εκκινητή (5'→3') χρησιμοποιείται το online tool Reverse Complement [56].

Για την In-Fusion κλωνοποίηση χρησιμοποιείται το In-Fusion Cloning Kit (Takara), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι In-Fusion εκκινητές χρησιμοποιούνται για να πολλαπλασιαστούν με PCR τα επιθυμητά γονίδια χρησιμοποιώντας ως template το pMini με το κάθε γονίδιο από το κωδικόνιο έναρξης μέχρι το κωδικόνιο λήξης, συμπεριλαμβανομένου και του His_6-tag στο καρβοξυτελικό άκρο, καθώς και των 15 συμπληρωματικών βάσεων με το γραμμικό πλασμίδιο από την κάθε πλευρά. Το γραμμικό πλασμίδιο (pET22b(+)-linear) δημιουργείται με PCR (PCR linearization), χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές. Τα γονίδια αλλά και το γραμμικό πλασμίδιο απομονώνονται από την πηκτή αγαρόζης και μετριέται η συγκέντρωσή τους. Ο λόγος του γονιδίου ως προς το γραμμικό πλασμίδιο (insert to vector ratio) που χρησιμοποιείται είναι 2:1. Οι ποσότητες που πρέπει να προστεθούν υπολογίζονται από το online tool της NEB (NebioCalculator, NEB) [53]. Η αντίδραση In-Fusion γίνεται για 15 λεπτά στους 37°C και για άλλα 15 λεπτά στους 50°C.

Από την αντίδραση In-Fusion χρησιμοποιούνται 2,5 μl για μετασχηματισμό σε Turbo Competent *E. coli*. Οι αποικίες ελέγχονται προκειμένου να βρεθεί το σωστό

πλασμίδιο (έλεγχος αλληλούχισης για τυχόν μεταλλάξεις). Το τελικό πλασμίδιο (pET22b(+)-γονίδιο) χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό σε κύτταρα έκφρασης (BL21(DE3)Gold).

2.10 Έλεγχος έκφρασης πρωτεϊνών

Εφόσον έχει γίνει επιτυχής κλωνοποίηση και μετασχηματισμός σε κατάλληλα κύτταρα, ελέγχονται τα επίπεδα έκφρασης. Το πλασμίδιο pET22b(+) περιέχει το οπερόνιο της λακτόζης και ως επαγωγέας της έκφρασης χρησιμοποιείται το Isopropyl β-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Προκειμένου να ελεγχθεί αν υπάρχει έκφραση, δοκιμάζονται διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας της καλλιέργειας (25°C, 37°C), διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG (0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM) για την επαγωγή όταν η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας είναι OD_{600}=0,4-0,6 και διαφορετικοί χρόνοι συλλογής κυττάρων μετά την επαγωγή (2 ώρες, 4 ώρες και 16-18 ώρες).

Τα τεστ έκφρασης γίνονται σε μικρής κλίμακας καλλιέργειες (50 ml LB + 100 μg/ml αμπικιλλίνη). Για κάθε συνθήκη (θερμοκρασίας, συγκέντρωσης IPTG και χρόνου) συλλέγεται 1 ml καλλιέργειας και τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντριση στα 18.000 x *g* για 1 λεπτό (Eppendorf 5424 Microcentrifuge). Λύση των κυττάρων γίνεται με προσθήκη 100 μl διαλύματος 20% SDS, ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά. Μετά την επώαση, γίνεται φυγοκέντριση στα 20.000 x *g* για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο χρησιμοποιείται για SDS-PAGE και Western Blot για την ανίχνευση του His_6-tag στην εκφραζόμενη πρωτεΐνη**.** Η ανίχνευση γίνεται με επώαση για μια ώρα με 1:2000 anti-His antibody A.P. conjugated για να ελεγχθεί αν υπάρχει έκφραση, κι αν ναι, σε ποιες συνθήκες αυτή είναι βέλτιστη.

2.11 Απομόνωση πρωτεϊνών-στόχων

Μόλις γίνουν οι έλεγχοι έκφρασης και είναι γνωστές οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης, γίνεται η έκφραση τους σε μεγάλη κλίμακα για την απομόνωση των πρωτεϊνών-στόχων.

2.11.1 Καλλιέργειες

Γίνονται καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (3 X 2L LB medium με 50 μg/ml καρβενικιλλίνη) για κάθε έναν από τους στόχους, στις βέλτιστες για τον κάθε στόχο

συνθήκες θερμοκρασίας, συγκέντρωσης επαγωγέα και χρόνου συλλογής κυττάρων μετά την επαγωγή.

Η συλλογή των κυττάρων γίνεται με φυγοκέντριση (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter) στα 8.000 x *g*, για 15 λεπτά, στους 4°C. Τα κύτταρα ζυγίζονται και μοιράζονται σε Falcon με περίπου 10 g κυττάρων ανά Falcon. Τα κύτταρα ψύχονται με υγρό άζωτο και φυλάσσονται στους -80°C έως ότου χρησιμοποιηθούν.

2.11.2 Λύση κυττάρων

Τα κύτταρα που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση πρωτεΐνης, ξεπαγώνονται και επαναιωρούνται σε παγωμένο διάλυμα επαναιώρησης. Εάν πρόκειται να απομονωθεί υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη, το διάλυμα επαναιώρησης είναι 50 mM Tris/HCl, pH=8, 200 mM NaCl. Αν πρόκειται για μεμβρανική πρωτεΐνη, το διάλυμα επαναιώρησης είναι 10 mM Tris/HCl, pH=8, 250 mM Saccharose, 150 mM Choline Chloride (TSC buffer). Για κάθε g κυττάρων προστίθενται 5-10 ml διαλύματος και επωάζονται με ανάδευση για 15 λεπτά στους 4°C. Μετά την επώαση, προστίθενται Pefablock, DNaseI και 8 mM $MgCl_2$.

Για το σπάσιμο των κυττάρων χρησιμοποιείται το Microfluidizer M-110L, στα 8.000 psi, για 6 φορές. Όλη η διαδικασία σπασίματος των κυττάρων γίνεται σε πάγο.

2.11.3 Απομόνωση υδατοδιαλυτού πρωτεϊνώματος

Για τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, μετά το σπάσιμο των κυττάρων, το δείγμα υπερφυγοκεντρείται (Optima L-90K, Beckman Coulter) στα 80.000 x *g*, για 40 λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται, προστίθενται 20mM Imidazole, φιλτράρεται με Whatman Filter 0,2 μm και παραμένει σε πάγο μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

2.11.4 Απομόνωση μεμβρανικού πρωτεϊνώματος

Για απομόνωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών, πρώτο βήμα είναι η απομόνωση των μεμβρανών. Μετά το σπάσιμο των κυττάρων, το δείγμα φυγοκεντρείται (RC-5B, Sorvall) στα 24.000 x *g*, για 1 ώρα, στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και υπερφυγοκεντρείται (Optima L-90K, Beckman Coulter) στα 145.000 x *g*, για 3 ώρες, στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα που αποτελείται από τις μεμβράνες των κυττάρων επαναιωρείται με τη βοήθεια ενός πινέλου σε 10-20 ml TSC διαλύματος. Η πρωτεϊνική συγκέντρωση μετριέται με BCA assay. Οι μεμβράνες

χωρίζονται σε aliquots (~100 mg). Τα aliquots ψύχονται με υγρό άζωτο και φυλάσσονται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.11.5 Διαλυτοποίηση μεμβρανικών πρωτεϊνών

Για την διαλυτοποίηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών (~100 mg), προστίθενται 100 mM Tris/HCl, pH=7,5, 25% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) β-DDM, 300 mM NaCl και 20 mM Imidazole σε τελικό όγκο 20 ml. Η διαλυτοποίηση γίνεται για 1 ώρα, με ανάδευση, στους 4°C. Έπειτα, γίνεται υπερφυγοκέντριση του δείγματος στα 223.000 x *g*, για 1:30 ώρα, στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται, φιλτράρεται με Whatman Filter 0,2 μm και παραμένει σε πάγο μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

2.11.6 Χρωματογραφία συγγένειας (Affinity Chromatography)

Για την απομόνωση των πρωτεϊνών-στόχων χρησιμοποιείται το His_6-tag που έχει προστεθεί σε αυτές, μέσω χρωματογραφίας συγγένειας (Affinity Chromatography).

2.11.6.1 Batch Method Ni-NTA

Για την απομόνωση με την Batch Method, χρησιμοποιείται 1,5 ml υλικού στήλης Ni-NTA (Qiagen) και ροή βαρύτητας (gravity flow). Το υλικό αφήνεται να καθιζάνει και πλένεται με όγκο ίσο με 20 φορές τον όγκο της στήλης (Column Volums, CVs) με παγωμένο H_2O. Έπειτα, η στήλη εξισορροπείται με 20 CVs με το Binding Buffer (20 mM Tris/HCl, pH=8, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole). Μετά την εξισορρόπηση, το υπερκείμενο (πρωτεϊνικό εκχύλισμα) επωάζεται με το υλικό της στήλης, για 1 ώρα, με ανάδευση, στους 4°C. Μετά την επώαση, το υλικό αφήνεται να καθιζάνει και το Flow Through απομακρύνεται. Η στήλη πλένεται με 20 CVs από το πρώτο Elution Buffer (20 mM Tris/HCl, pH=8, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole). Το Flow Through συλλέγεται και η στήλη πλένεται με 20 CVs από το δεύτερο Elution Buffer (20 mM Tris/HCl, pH=8, 500 mM NaCl, 50 mM Imidazole). Το Flow Through συλλέγεται και η στήλη πλένεται με 20 CVs (το καθένα) από διάφορα Elution Buffers με αυξανόμενη συγκέντρωση Imidazole. Συνολικά οι συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου που χρησιμοποιούνται για την έκλουση των πρωτεϊνών είναι 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM και 500 mM Imidazole. Όλα τα Flow Through (κλάσματα) συλλέγονται και ελέγχονται με SDS-PAGE και Western Blot με 1:2000 anti-His antibody για την ανίχνευση της πρωτεΐνης στόχου. Τα κλάσματα που την περιέχουν

συλλέγονται, συγκεντρώνονται με Amicon (cut-off 10 kDa) και το συμπυκνωμένο δείγμα αραιώνεται με το Binding Buffer, για να μειωθεί η συγκέντρωση από το ιμιδαζόλιο.

2.11.6.2 His-Trap HP 5 ml

Για την απομόνωση με στήλη His-Trap HP 5 ml (GE Healthcare), χρησιμοποιείται το σύστημα Äkta Chromatography System. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι φιλτραρισμένα με 0,22 μm φίλτρο, απαερωμένα και παγωμένα. Η στήλη πλένεται με 10 CVs με H_2O και με 10 CVs διαλύματος Α (20 mM Tris/HCl, pH=8, 500 mM NaCl). Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα προσδένεται με το υλικό της στήλης, περνώντας το από αυτήν, χρησιμοποιώντας την περισταλτική αντλία, με ταχύτητα ροής ~1-1,5 ml/min. Για την έκλουση των πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται το σύστημα Äkta. Η στήλη προσδένεται στην Äkta και πλένεται με 20 CVs με διάλυμα 20 mM Tris/HCl, pH=8, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole. Έπειτα πλένεται με 20 CVs με διάλυμα 20 mM Tris/HCl, pH=8, 500 mM NaCl, 50 mM Imidazole. Μετά ξεκινάει γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης ιμιδαζολίου για 30 CVs από 50 mM Imidazole μέχρι 250 mM Imidazole. Τέλος, η στήλη πλένεται με 20 CVs με διάλυμα 20 mM Tris/HCl, pH=8, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazole. Σε όλη τη διάρκεια της έκλουσης συλλέγονται κλάσματα των 1,5 ml. Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα, ελέγχονται αντιπροσωπευτικά κλάσματα από όλες τις κορυφές (αρχή, μέση και τέλος κάθε κορυφής) με SDS-PAGE και Western Blot για την ανίχνευση της πρωτεΐνης-στόχου. Τα κλάσματα που την περιέχουν συλλέγονται, συγκεντρώνονται με Amicon (cut-off 10 kDa) και ξεπλένονται με το Binding Buffer, για να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο.

2.11.7 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Size Exclusion Chromatography)

Μετά την συγκέντρωση και απομάκρυνση του ιμιδαζολίου, η πρωτεΐνη-στόχος μπορεί να καθαριστεί περαιτέρω μέσω χρωματογραφίας μοριακού αποκλεισμού (Size Exclusion Chromatography) με Äkta Chromatography System. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι φιλτραρισμένα με 0,22μm φίλτρο, απαερωμένα και παγωμένα. Χρησιμοποιείται στήλη Superdex 200 Increase 10/300 (Sigma-Aldrich). Η στήλη πλένεται με 5 CVs με H_2O και με 5 CVs διαλύματος. Αν η πρωτεΐνη-στόχος είναι κυτταροπλασματική χρησιμοποιείται το διάλυμα 20 mM Tris/HCl, pH=7,5, 150 mM

NaCl. Αν η πρωτεΐνη-στόχος είναι μεμβρανική χρησιμοποιείται το διάλυμα 20 mM Tris/HCl, pH=7,5, 150 mM NaCl, 0,02% (w/v) β-DDM.

Το συμπυκνωμένο δείγμα (500 μl) φιλτράρεται μέσω φυγοκέντρισης στα 3.000 x *g* για 5 λεπτά με Ultrafree Centrifugal Filter (Millipore) και εισάγεται στην Äkta. Από το χρωματογράφημα, επιλέγονται τα κλάσματα ενδιαφέροντος και ελέγχονται με SDS-PAGE. Τα επιθυμητά κλάσματα συλλέγονται, ψύχονται με υγρό άζωτο και φυλάσσονται στους -80°C.

2.12 Blue Native Page

Για την ηλεκτροφόρηση Blue Native Page, χρησιμοποιούνται πηκτές 4-16% Native Page Bis-Tris Protein Gels (Invitrogen). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε συσκευή XCell SureLock™ Electrophoresis Cell device (Invitrogen), με διάλυμα ανόδου (2,5 mM Bis Tris, 2,5 mM Tricine, pH= 6.8) και καθόδου (2,5 mM Bis Tris, 2,5 mM Tricine, pH= 6.8, 0,02% (w/v) Coomassie Blue G-250). Τα δείγματα αναμειγνύονται με 4X sample buffer (50 mM BisTris, 6 N HCl, 50 mM NaCl, 10% (w/v) glycerol, 0,001% (w/v) Ponceau S, pH~7.2) (NativePAGE 4X sample buffer, Thermo Scientific). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 150 V για 60 λεπτά, στους 4°C κι έπειτα στα 250 V για 30 λεπτά, στους 4°C. Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή αποχρωματίζεται σε διάλυμα αποχρωματισμού.

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1 ELISA

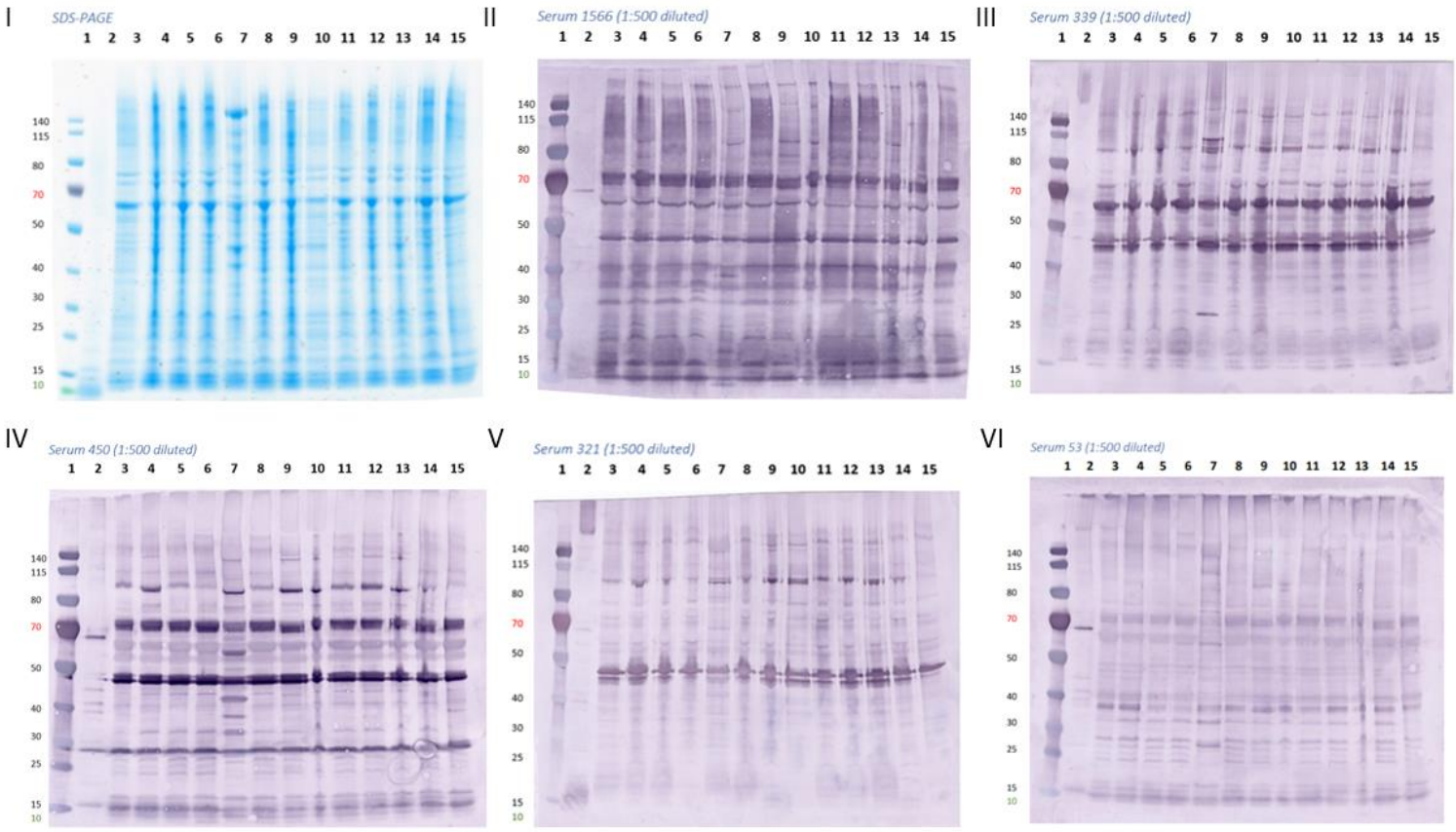
Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 43 περιβαλλοντικά στελέχη και 2 στελέχη που είχαν απομονωθεί από ασθενείς. Τα περιβαλλοντικά στελέχη απομονώθηκαν από υδραυλικά συστήματα ξενοδοχείων της Κρήτης. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν *Legionella pneumophila* serogroup 1. Η ταυτοποίηση του ορότυπου έγινε με το Direct DFA Kit for *Legionella pneumophila* serogroup 1 (Pro-lab). Τα περιβαλλοντικά στελέχη είναι αγνώστου strain, αφού το γονιδίωμα τους δεν έχει αλληλουχηθεί και δεν έχει καταχωρηθεί στην βάση δεδομένων της NCBI.

Για την βελτιστοποίηση της ELISA χρησιμοποιήθηκε το περιβαλλοντικό στέλεχος (1204) της *Legionella pneumophila 1* κι ένας ορός ασθενή (367I). Οι βέλτιστες συνθήκες ήταν 2 μg πρωτεϊνικού δείγματος ανά πηγαδάκι και μέτρηση απορρόφησης στα 450 nm. Αναλυτικά τα αποτελέσματα της ELISA φαίνονται στο Παράρτημα (Ενότητα Α).

Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι κάθε στέλεχος αλληλεπίδρασε διαφορετικά με τους διάφορους ορούς, αλλά και ότι οι οροί δεν αλληλεπίδρασαν ακριβώς με τον ίδιο τρόπο με όλα τα στελέχη.

3.2 SDS-PAGE και Western Blot στελεχών με διάφορους ορούς

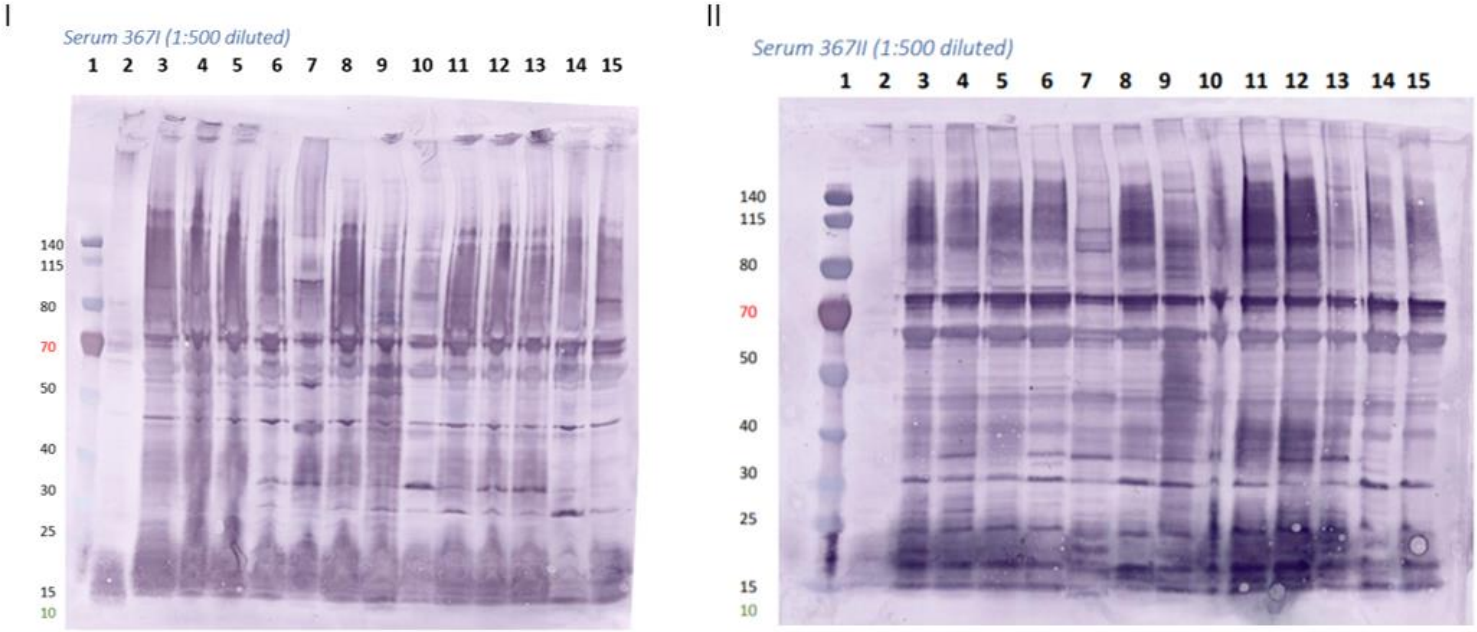
Τα στελέχη που ελέγχθηκαν με ELISA, ελέγχθηκαν και με Western Blot. Για το Western Blot, οι οροί των ασθενών χρησιμοποιήθηκαν ως πρωτοταγές αντίσωμα (1:500 αραίωση). Παρακάτω φαίνονται ενδεικτικά τα διαφορετικά μοτίβα από πέντε διαφορετικούς ορούς (1566, 339, 450, 321, 53).



Εικόνα 3 SDS-PAGE και Western Blot με διάφορα στελέχη και διάφορους ορούς. I) SDS-PAGE, II) Western Blot με τον ορό 1566 (1:500 αραίωση) ως πρωτοταγές αντίσωμα, III) Western Blot με τον ορό 339 (1:500 αραίωση), IV) Western Blot με τον ορό 450 (1:500 αραίωση, V) Western Blot με τον ορό 321 (1:500 αραίωση), VI) Western Blot με τον ορό 53 (1:500 αραίωση). 1) Marker, 2) LpATTC, 3) 1204, 4) Hesse, 5) Jetten, 6) 16232, 7) 17284, 8) 17440, 9) 6991, 10) 745, 11) 9803, 12) 12200, 13) 8280, 14) 6304, 15) 6645.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3, τα διάφορα στελέχη μεταξύ τους, κατά κανόνα, αλληλεπίδρασαν με τον ίδιο τρόπο με τον κάθε ορό στο Western Blot. Μόνες εξαιρέσεις είναι τα στελέχη 4273 και το στέλεχος αναφοράς LpATCC. Το στέλεχος αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε είναι *Legionella pneumophila sg1 strain Philadelphia*, αλλά τα περιβαλλοντικά που έχουν απομονωθεί από την Κρήτη (*Legionella pneumophila sg1)* δεν είναι πανομοιότυπα με αυτό. Τα περιβαλλοντικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι αγνώστου strain. Επίσης, το 4273 ίσως να ήταν κάποιο άλλο στέλεχος *Legionella pneumophila* και γι' αυτό να έδωσε λίγο διαφορετικό μοτίβο από τα υπόλοιπα. Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι αναλόγως τον ορό, τα μοτίβα άλλαξαν εξαιρετικά. Αυτό σημαίνει ότι οι ασθενείς από τους οποίους λήφθηκαν οι οροί, δημιούργησαν αντισώματα έναντι διαφορετικών πρωτεϊνών-στόχων. Αν η μόνη διαφορά των ορών ήταν η συγκέντρωση των αντισωμάτων, απλά θα άλλαζε η ένταση του σήματος, όχι το μοτίβο.

Επίσης, από έναν ασθενή (367) χρησιμοποιήθηκαν δύο οροί οι οποίοι ελήφθησαν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Ο πρώτος (367I) λήφθηκε κατά τη διάρκεια της νόσου και ο δεύτερος (367II) λήφθηκε μετά την ανάρρωση. Οι οροί αυτοί έδωσαν διαφορετικά μοτίβα στο Western Blot με τα ίδια ακριβώς δείγματα, όπως φαίνονται στην Εικόνα 4. Αυτό σημαίνει ότι τα υπάρχοντα αντισώματα δεν ήταν ακριβώς τα ίδια και για τους δύο ορούς. Στον δεύτερο ορό, η συγκέντρωση κάποιων αντισωμάτων είχε μειωθεί, αλλά είχαν δημιουργηθεί και καινούρια αντισώματα έναντι διαφορετικών πρωτεϊνών-στόχων, πράγμα που δείχνει ότι ο οργανισμός διαφοροποιεί τα αντισώματα του με την εξέλιξη της νόσου.

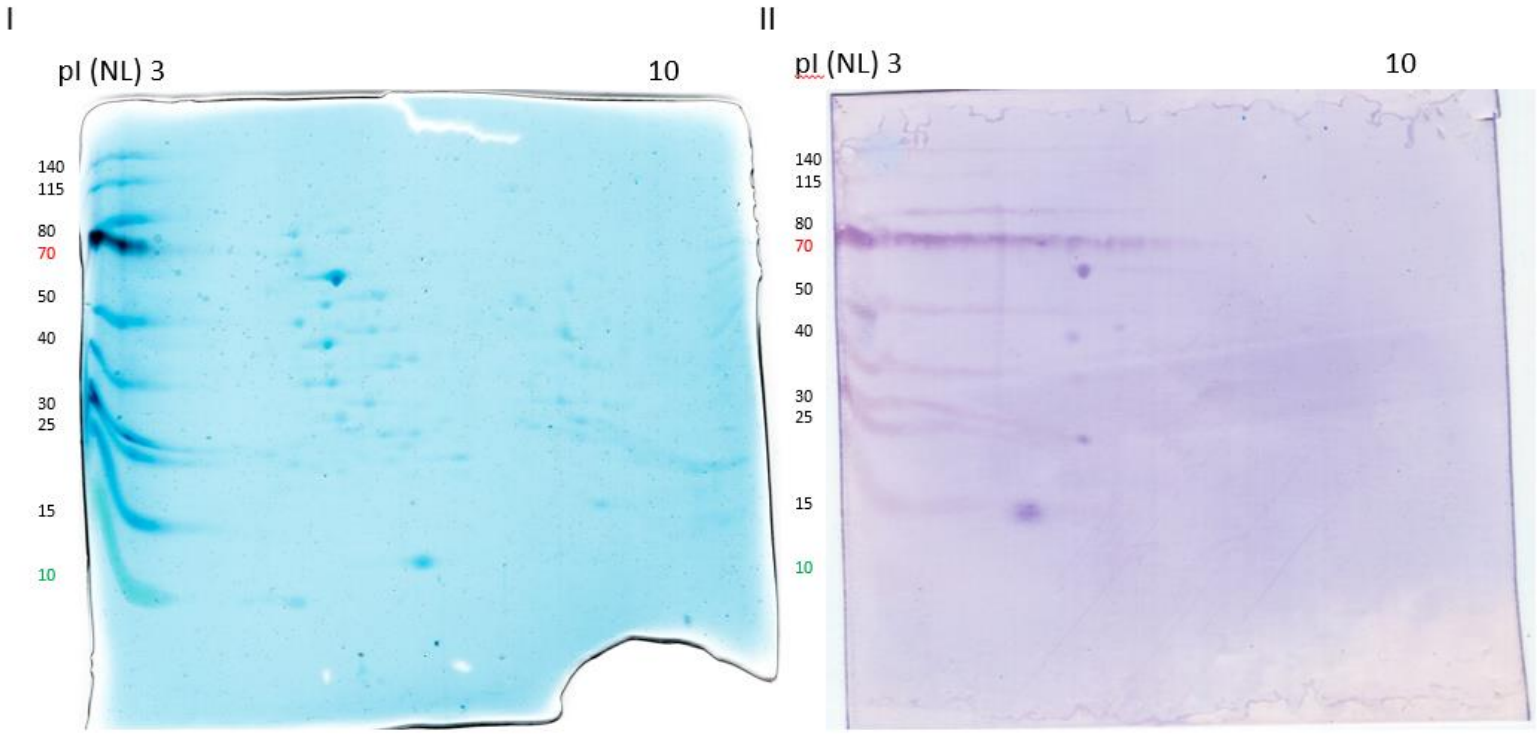


Εικόνα 4 Western Blot με ορούς από τον ίδιο ασθενή (367). I) Western Blot με τον ορό 367I (1:500 αραίωση), II) Western Blot με τον ορό 367II (1:500 αραίωση). 1) Marker, 2) LpATTC, 3) 1204, 4) Hesse, 5) Jetten, 6) 16232, 7) 17284, 8) 17440, 9) 6991, 10) 745, 11) 9803, 12) 12200, 13) 8280, 14) 6304, 15) 6645.

Από τα SDS-PAGE κόπηκαν οι λωρίδες οι οποίες έδωσαν σήμα στο Western Blot για να ταυτοποιηθούν οι πρωτεΐνες. Όμως, τα δείγματα ήταν πολύπλοκα και οι πρωτεΐνες δεν διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά, οπότε τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης ήταν λίστες με 250-350 πρωτεΐνες για την κάθε λωρίδα. Προκειμένου να διαχωριστούν καλύτερα οι πρωτεΐνες και να είναι πιο αντιπροσωπευτικά και αξιόπιστα τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης, έγινε δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση. και αντίστοιχα, ταυτοποιήθηκαν τα σημεία τα οποία έδωσαν σήμα στο Western Blot.

3.3 Δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση 2DE IEF/SDS-PAGE

Για τη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 100 μg πρωτεϊνικού δείγματος από ένα περιβαλλοντικό στέλεχος (6091) και για το Western Blot χρησιμοποιήθηκε ο ορός 367I (1:500 αραίωση). Τα σημεία που έδωσαν σήμα στο Western Blot, ταυτοποιήθηκαν και λήφθηκαν υπόψιν οι πρωτεΐνες με υψηλό score για το κάθε σημείο. Στην Εικόνα 5 φαίνεται η πηκτή και το αντίστοιχο Western Blot.



Εικόνα 5 I) Πηκτή 2DE IEF/SDS-PAGE, II) Western Blot με τον ορό 367I (1:500 αραίωση)

3.4 Επιλογή πρωτεϊνών-στόχων

Η επιλογή των πρωτεϊνών-στόχων έγινε χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης και από τις δύο πηκτές (SDS-PAGE και IEF/SDS-PAGE) καθώς και την βιβλιογραφία για τις αντιγονικές πρωτεΐνες της *Coxiella burnetii* [57], διότι μέχρι σήμερα δεν υπάρχει αντίστοιχη βιβλιογραφία για αντιγονικές πρωτεΐνες της *Legionella pneumophila*. Οι πρωτεΐνες που επιλέχθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1 Επιλεγμένες πρωτεΐνες-στόχοι για έλεγχο αντιγονικότητας.

#	Protein Name	Gene Name	Molecular Weight (kDa)	Location
1	Elongation Factor G	lpg0326_fusA	77	Cytoplasm
2	Chaperone DnaK	lpg2025_dnak	70	Cytoplasm
3	Elongation Factor T	lpg0314_tuf2	43	Cytoplasm
4	27 kDa outer membrane protein	lpg1841_com1	28	Outer Membrane
5	Phosphocholine transferase	lpg0695_legA8	107	Secreted
6	SdcA	lpg2510	105	Unknown
7	SidC	lpg2511_sidc	105	Unknown
8	Elongation Factor T 2	lpg0327_tufb	43	Cytoplasm
9	Dihydrolipoamide succinyltransferase	lpg0533_sucB	45	Cytoplasm
10	Major outer membrane protein	lpg1974	33	Outer Membrane
11	60 kDa chaperonin HtpB	lpg0688_htpB	58	Cytoplasm
12	Chaperone HtpG	lpg1369_htpG	71	Cytoplasm
13	OmpH	lpg0507_ompH	19	Outer Membrane
14	ABCtransporter ATP-binding	lpg0773_ABCtransp	54	Cytoplasm
15	RdgC	lpg1187_rdgC	36	Nucleoid
16	IcmK (dotH)	lpg0450_icmK	39	Outer Membrane
17	IcmG (dotF)	lpg0452_icmG	29	Transmembrane

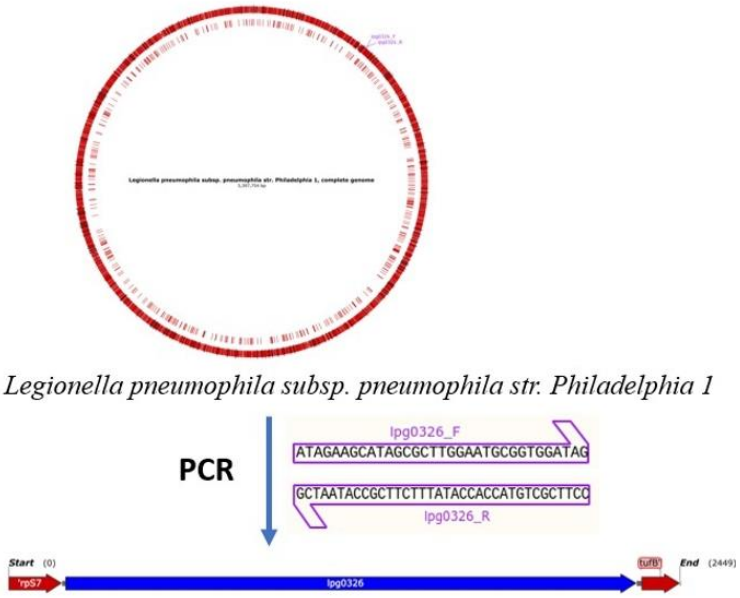
3.5 Κλωνοποίηση στόχων

Η διαδικασία κλωνοποίησης που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1) απομόνωση γενωμικού gDNA από την *Legionella pneumophila sg1* (1204),
2) κλωνοποίησή τους σε πλασμίδιο για αλληλούχιση (μιας και το gDNA που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη δεν είναι καταχωρημένο στην NCBI και ως template έχει χρησιμοποιηθεί το γονιδίωμα της *Legionella pneumophila subsp. pneumophila str. Philadelphia 1*) και
3) κλωνοποίηση τους σε πλασμίδιο έκφρασης και αλληλούχιση τελικών πλασμιδίων.

3.5.1 PCR

Το πρώτο βήμα της κλωνοποίησης ήταν ο πολλαπλασιασμός των επιθυμητών γονιδίων. Η διαδικασία αυτή φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 6 για τον στόχο lpg0326. Ομοίως έγινε και για τους υπόλοιπους στόχους. Ως template για τις PCR χρησιμοποιήθηκε το γενωμικό DNA της *Legionella pneumophila sg1* (1204), ενός περιβαλλοντικού στελέχους το οποίο απομονώθηκε από την Κρήτη. Οι primers (φαίνονται στην Ενότητα C στο Παράρτημα) για όλους τους στόχους σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας ως template το γενωμικό DNA της *Legionella pneumophila subsp. pneumophila str. Philadelphia 1.*



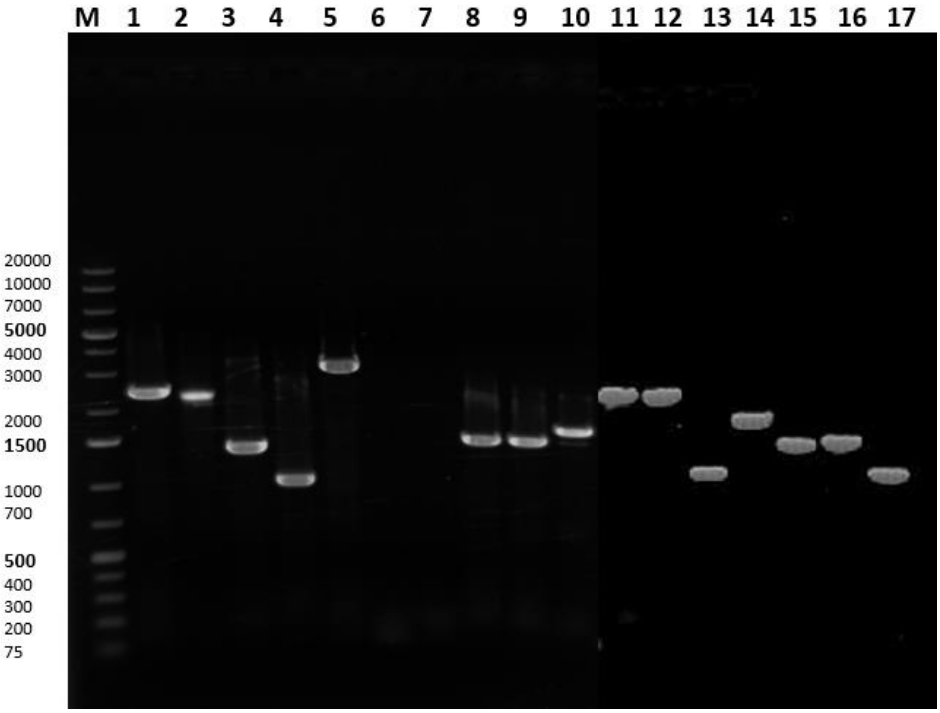
Εικόνα 6 Σχηματικά η διαδικασία της PCR για τον πολλαπλασιασμό του επιθυμητού γονιδίου.

Οι συνθήκες για την PCR (annealing temperature, extension time) για όλους τους στόχους φαίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2 Συνθήκες για την PCR (Annealing temperature, Extension Time).

#	Protein Name	Gene Name	Gene Length (bps)	Annealing Temperature (°C)	Extension Time (sec)
1	Elongation Factor G	lpg0326_fusA	2449	60	75
2	Chaperone DnaK	lpg2025_dnak	2322	60	75
3	Elongation Factor T	lpg0314_tuf2	1400	60	60
4	27 kDa outer membrane protein	lpg1841_com1	1024	60	60
5	Phosphocholine transferase	lpg0695_legA8	3361	60	120
6	SdcA	lpg2510	2826	60	120
7	SidC	lpg2511_sidc	2941	60	120
8	Elongation Factor T 2	lpg0327_tufb	1539	60	50
9	Dihydrolipoamide succinyltransferase	lpg0533_sucB	1544	60	50
10	Major outer membrane protein	lpg1974	1761	60	50
11	60 kDa chaperonin HtpB	lpg0688_htpB	2348	62	75
12	Chaperone HtpG	lpg1369_htpG	2277	62	75
13	OmpH	lpg0507_ompH	1070	62	60
14	ABCtransporter ATP-binding	lpg0773_ABCtransp	1745	62	75
15	RdgC	lpg1187_rdgC	1387	62	60
16	IcmK (dotH)	lpg0450_icmK	1430	62	60
17	IcmG (dotF)	lpg0452_icmG	1086	62	60

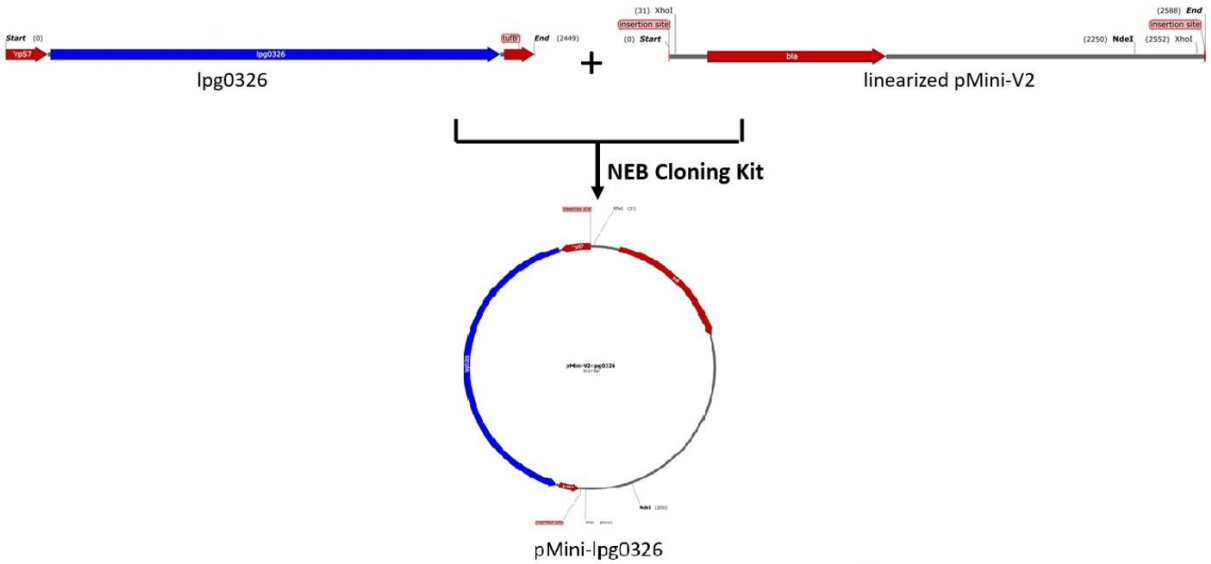
Στην Εικόνα 7 φαίνονται τα προϊόντα της PCR για όλους τους στόχους. Οι στόχοι 6, 7 δεν πολλαπλασιάστηκαν με τις αρχικές συνθήκες, οπότε έγινε gradient PCR (55-65°C), PCR με μικρότερη συγκέντρωση gDNA καθώς και PCR με διαφορετική πολυμεράση (Minotech) αλλά σε καμία περίπτωση δεν πολλαπλασιάστηκαν τα επιθυμητά γονίδια. Για τους υπόλοιπους στόχους τα προϊόντα φαίνονται βάσει των μοριακών βαρών να είναι τα επιθυμητά γονίδια.



Εικόνα 7 Προϊόντα της PCR. Marker, 1-17 γονίδια-στόχοι

3.5.2 Εισαγωγή DNA σε πλασμίδιο pMini

Για τους στόχους όπου έδωσαν προϊόν στην PCR, χρησιμοποιήθηκε το NEB Cloning Kit (insert to vector ratio 3:1) για την κλωνοποίησή τους σε πλασμίδιο pMini προκειμένου να αλληλουχηθούν. Η διαδικασία παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 8.



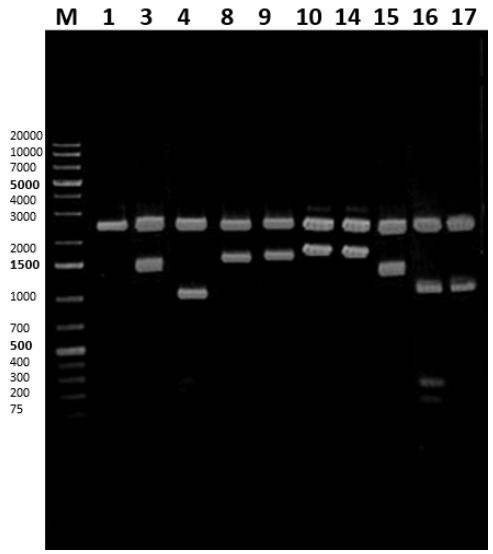
Εικόνα 8 Σχηματικά η διαδικασία εισαγωγής του επιθυμητού DNA στο πλασμίδιο pMini.

Για τον κάθε στόχο ελέγχθηκαν αρκετές αποικίες για να αυξηθεί η πιθανότητα εύρεσης του σωστού κλώνου. Για τον έλεγχο των κλώνων μετά την απομόνωση του πλασμιδίου από καλλιέργεια γινόταν πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα (XhoI ή/και NdeI). Στον Πίνακα 3 φαίνονται τα θραύσματα που προκύπτουν μετά από την πέψη των σωστών κλώνων. Οι κλώνοι που έδιναν προϊόν σωστού μεγέθους μετά την πέψη υποβάλλονταν σε αλληλούχιση για την επιβεβαίωση της σωστής αλληλουχίας τους αλλά και για τον έλεγχο ύπαρξης τυχών αλλαγών σε αυτήν.

Για τους στόχους 2, 5, 11, 12, 13 δεν ήταν δυνατή η απομόνωση σωστών κλώνων, παρά τις πολλαπλές προσπάθειες που έγιναν. Στην Εικόνα 9 παρουσιάζονται τα μοτίβα μετά την πέψη με XhoI για τους σωστούς κλώνους.

Πίνακας 3 Στον πίνακα φαίνονται τα μεγέθη των θραυσμάτων που προκύπτουν μετά από την πέψη των σωστών κλώνων με το περιοριστικό ένζυμο XhoI.

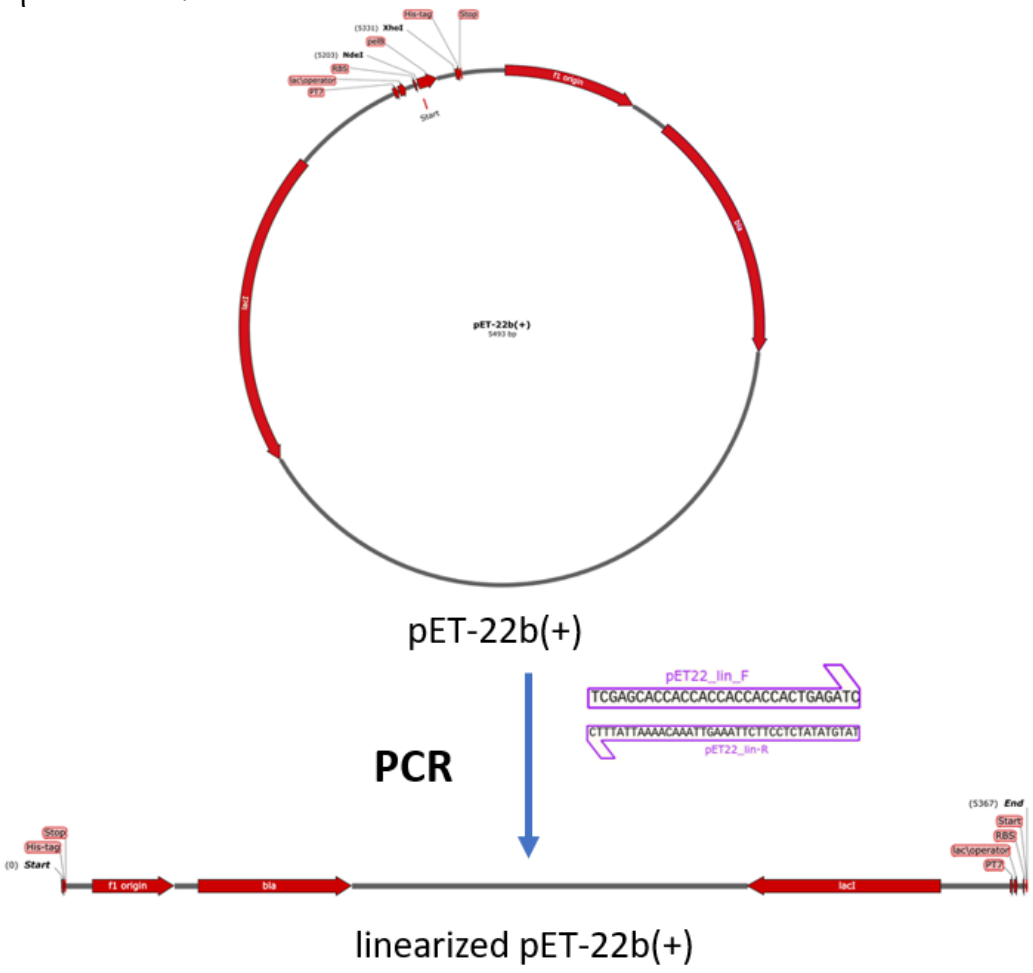
#	Gene Name	Fractions (bps) after digestion with XhoI
1	lpg0326_fusA	2521/2516
3	lpg0314_tuf2	2521/1456
4	lpg1841_com1	2521/1091
8	lpg0327_tufb	2521/1606
9	lpg0533_sucB	2521/1611
10	lpg1974	2521/1828
14	lpg0773_ABCtransp	2521/1812
15	lpg1187_rdgC	2521/1454
16	lpg0450_icmK	2521/1131/235/131
17	lpg0452_icmG	2521/1153



Εικόνα 9 Προϊόντα πέψης με το περιοριστικό ένζυμο XhoI, τα οποία έδωσαν σωστό μοτίβο και στάλθηκαν για αλληλούχιση. Marker, 1-17 γονίδια-στόχοι

3.5.3 Εισαγωγή DNA σε πλασμίδιο pET22b(+)

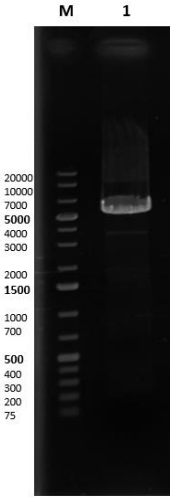
Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν ως template για τον σχεδιασμό καινούριων primers για In-Fusion κλωνοποίηση σε πλασμίδιο για έκφραση pET22b(+). Για το In-Fusion (insert to vector ratio 2:1) χρησιμοποιήθηκε το Takara In-Fusion Kit. Το γραμμικό πλασμίδιο δημιουργήθηκε μέσω PCR με κατάλληλους primers και συνθήκες όπως φαίνονται στον Πίνακα 4. Η διαδικασία φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 10. Το γραμμικό πλασμίδιο φαίνεται στην πηκτή αγαρόζης στην Εικόνα 11.



Εικόνα 10 Σχηματικά η δημιουργία του γραμμικού πλασμιδίου pET22b(+)

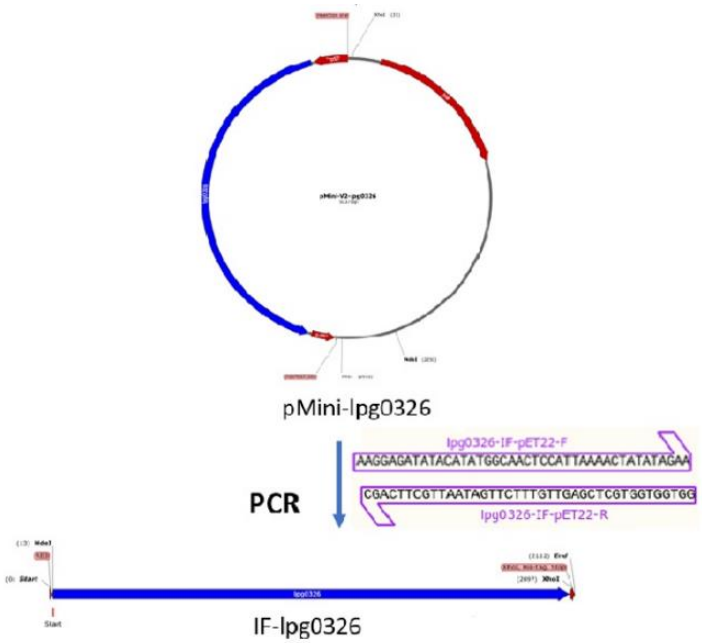
Πίνακας 4. Δημιουργία γραμμικού πλασμιδίου pET22b(+) μέσω PCR με κατάλληλους primers και συνθήκες όπως φαίνονται στον πίνακα.

#	Plasmid Name	Linear pET22b(+) (bps)	Annealing Temperature (°C)	Extension Time (sec)
1	Empty pET22b(+)	5367	63	90



Εικόνα 11 Γραμμικό πλασμίδιο pET22b(+) μετά από PCR. Marker, 1) Αντίδραση για δημιουργία γραμμικού pET22b(+)

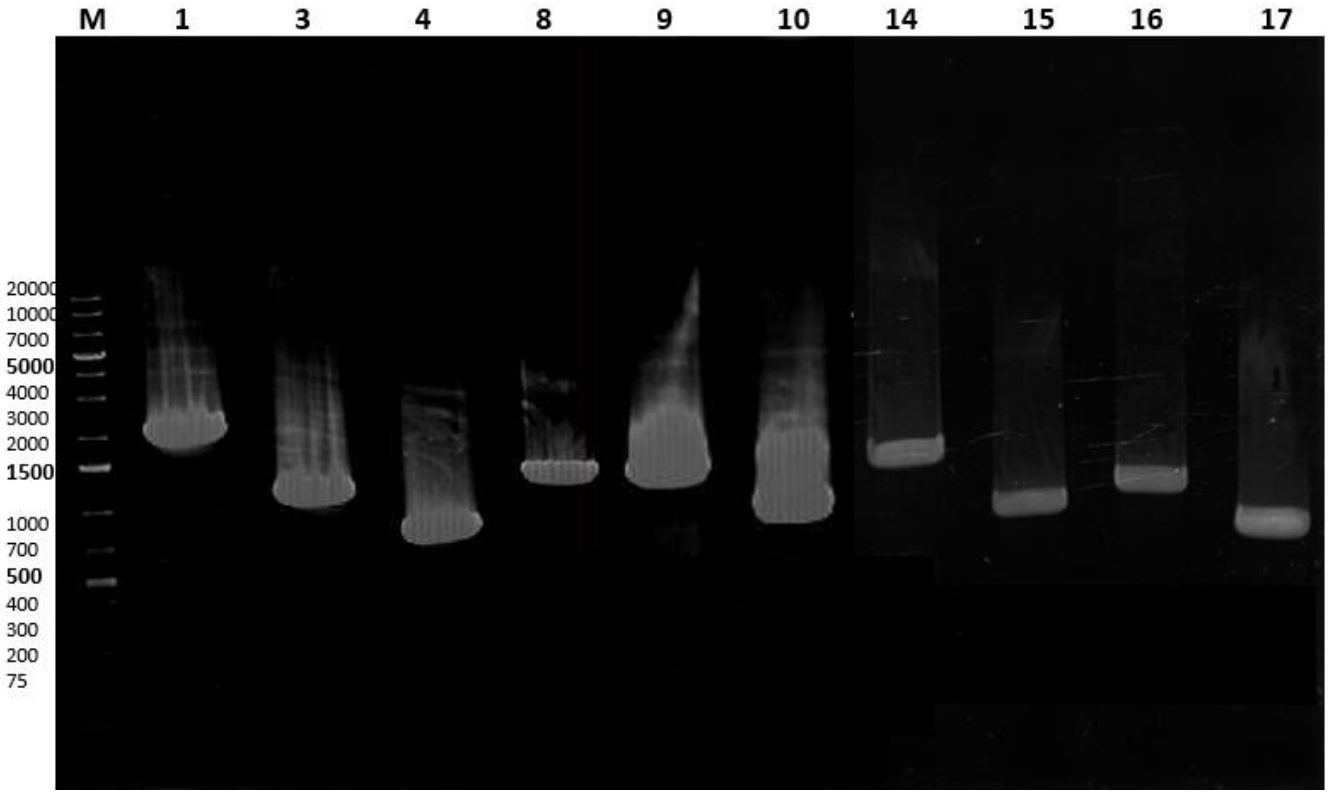
Εκτός από το γραμμικό πλασμίδιο, χρειάζονται και τα επιθυμητά γονίδια (από το κωδικόνιο έναρξης μέχρι το κωδικόνιο λήξης) τα οποία δημιουργήθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας τους καινούριους IF-primers που σχεδιάστηκαν με τις συνθήκες που φαίνονται στον Πίνακα 5. Ως template χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pMini με τα αντίστοιχα γονίδια. Η διαδικασία φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 12. Τα επιθυμητά τμήματα DNA φαίνονται στην Εικόνα 13.



Εικόνα 12 Σχηματικά η διαδικασία της PCR για τον πολλαπλασιασμό των επιθυμητών γονιδίων.

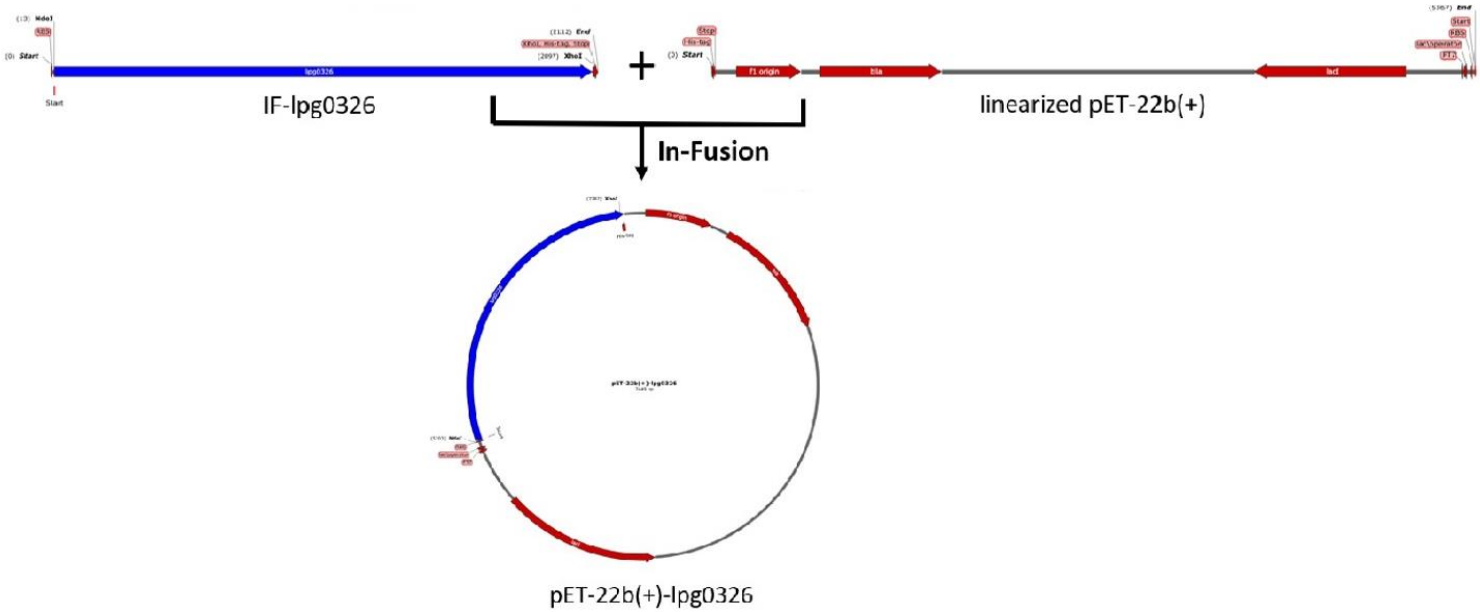
Πίνακας 5 Συνθήκες για PCR για την παραγωγή των επιθυμητών τμημάτων DNA (γονιδίων)

#	Protein Name	Gene Name	Gene Length (bps)	Annealing Temperature (°C)	Extension Time (sec)
1	Elongation Factor G	lpg0326_fusA	2112	65	40
3	Elongation Factor T	lpg0314_tuf2	1218	65	25
4	27 kDa outer membrane protein	lpg1841_com1	813	65	25
8	Elongation Factor T 2	lpg0327_tufb	1218	65	25
9	Dihydrolipoamide succinyltransferase	lpg0533_sucB	1257	65	25
10	Major outer membrane protein	lpg1974	921	65	25
14	ABCtransporter ATP-binding	lpg0773_ABCtransp	1452	65	35
15	RdgC	lpg1187_rdgC	972	65	25
16	IcmK (dotH)	lpg0450_icmK	1113	65	25
17	IcmG (dotF)	lpg0452_icmG	837	65	25



Εικόνα 13 Προϊόντα PCR με τους IF-Primers. Marker, 1-17 γονίδια-στόχοι

Η κλωνοποίηση In-Fusion έγινε χρησιμοποιώντας το γραμμικό πλασμίδιο pET22b(+) και τα επιθυμητά γονίδια-στόχους που δημιουργήθηκαν με την PCR με τους IF-primers. Η διαδικασία φαίνεται σχηματικά στην Εικόνα 14.

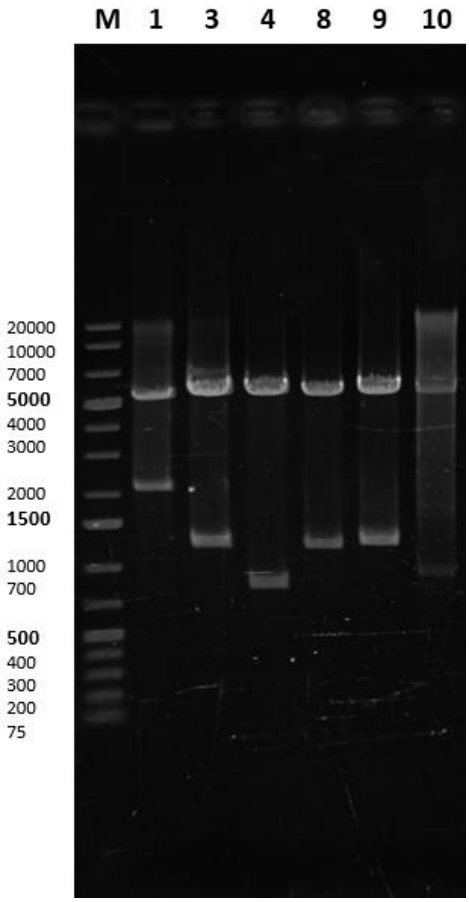


Εικόνα 14 Σχηματικά η διαδικασία εισαγωγής του επιθυμητού DNA στο πλασμίδιο pET22b(+)

Στον Πίνακα 6 φαίνονται τα θραύσματα που προκύπτουν από την πέψη των σωστών κλώνων με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και NdeI. Στην Εικόνα 15 φαίνονται τα προϊόντα πέψης των σωστών κλώνων. Όσοι κλώνοι ήταν οι σωστοί αλληλουχήθηκαν για πιστοποίηση της σωστής αλληλουχίας.

Πίνακας 6 Στον πίνακα φαίνονται τα μεγέθη των θραυσμάτων που προκύπτουν μετά από την πέψη των σωστών κλώνων με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI/NdeI.

#	Gene Name	Fractions (bps) after digestion with XhoI/NdeI
1	lpg0326_fusA	5365/2084
3	lpg0314_tuf2	5365/1190
4	lpg1841_com1	5365/785
8	lpg0327_tufb	5365/1190
9	lpg0533_sucB	5365/1229
10	lpg1974	5365/893



Εικόνα 15 Προϊόντα πέψης με XhoI/NdeI, τα οποία έδωσαν σωστό μοτίβο και στάλθηκαν για αλληλούχιση.

Για τους στόχους 14, 15, 16, 17 δεν βρέθηκαν σωστοί κλώνοι. Όλα τα βήματα κλωνοποίησης επαναλήφθηκαν από την αρχή αρκετές φορές, αλλά σε καμία περίπτωση δεν βρέθηκαν σωστοί κλώνοι.

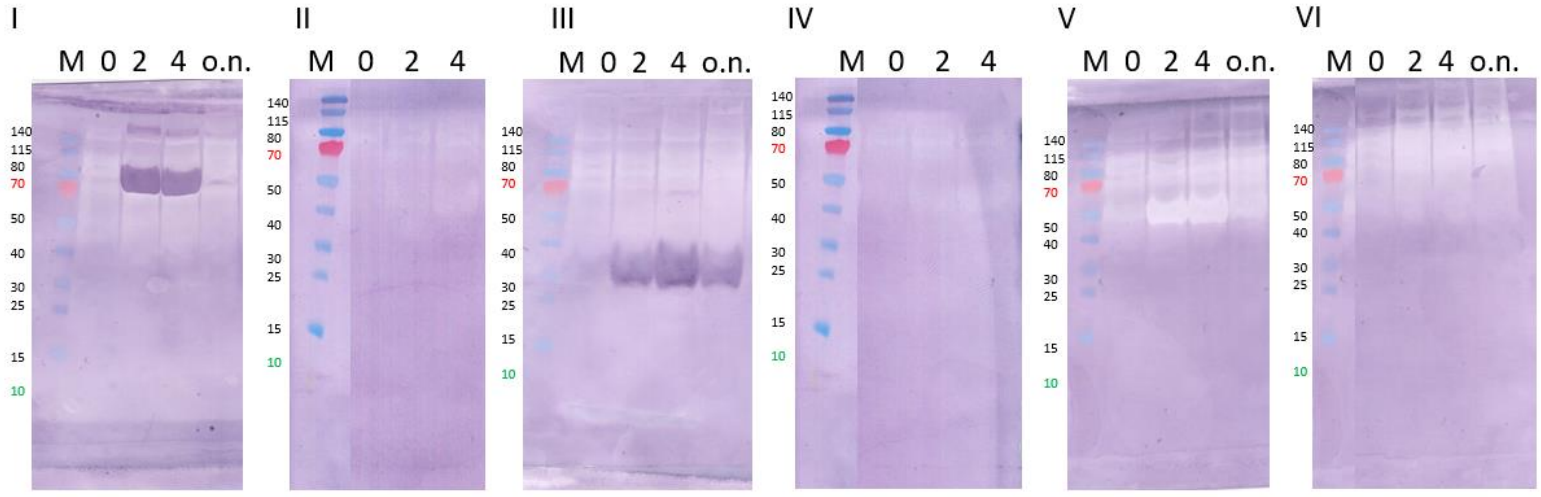
3.6 Έλεγχος έκφρασης

Μετά την επιτυχή κλωνοποίηση, τα τελικά πλασμίδια μετασχηματίζονται σε κύτταρα *E. coli* BL21(DE3)Gold και γίνονται τεστ έκφρασης. Οι βέλτιστες συνθήκες παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Στην Εικόνα 16 φαίνονται τα Western Blot με 1:2000 anti-His αντίσωμα. Η Major Outer Membrane Protein δεν έδωσε σήμα σε καμία από τις συνθήκες που ελέγχθηκαν. Οι πρωτεΐνες Elongation Factor T και Elongation Factor T2 έδωσαν σήμα χαμηλής έντασης (λευκές λωρίδες, "ghost bands") για την συνθήκη 25°C, 170 rpm, 0,5 mM IPTG, 4 ώρες μετά την επαγωγή. Οι πρωτεΐνες Elongation Factor G και 27 kDa Outer Membrane Protein έδωσαν ισχυρό σήμα για την συνθήκη 37°C, 170 rpm, 1 mM IPTG, 3 και 4 ώρες μετά την επαγωγή αντίστοιχα. Η

Dihydrolipoamide Succinyltransferase έδωσε ισχυρό σήμα (λευκές λωρίδες, "ghost bands") για την συνθήκη 37°C, 170 rpm, 1 mM IPTG, 4 ώρες μετά την επαγωγή.

Πίνακας 7 Παρακάτω φαίνονται οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης για την κάθε πρωτεΐνη-στόχο.

#	Protein Name	Molecular Weight (kDa)	Temperature (°C)	Shaking (rpm)	IPTG concentration (mM)	Time after induction (h)
1	Elongation Factor G	77	37	170	1	3
3	Elongation Factor T	43	25	170	0,5	4
4	27 kDa outer membrane protein	28	37	170	1	3
8	Elongation Factor T 2	43	25	170	0,5	4
9	Dihydrolipoamide succinyltransferase	45	37	170	1	4
10	Major outer membrane protein	33	37	170	0,1	4



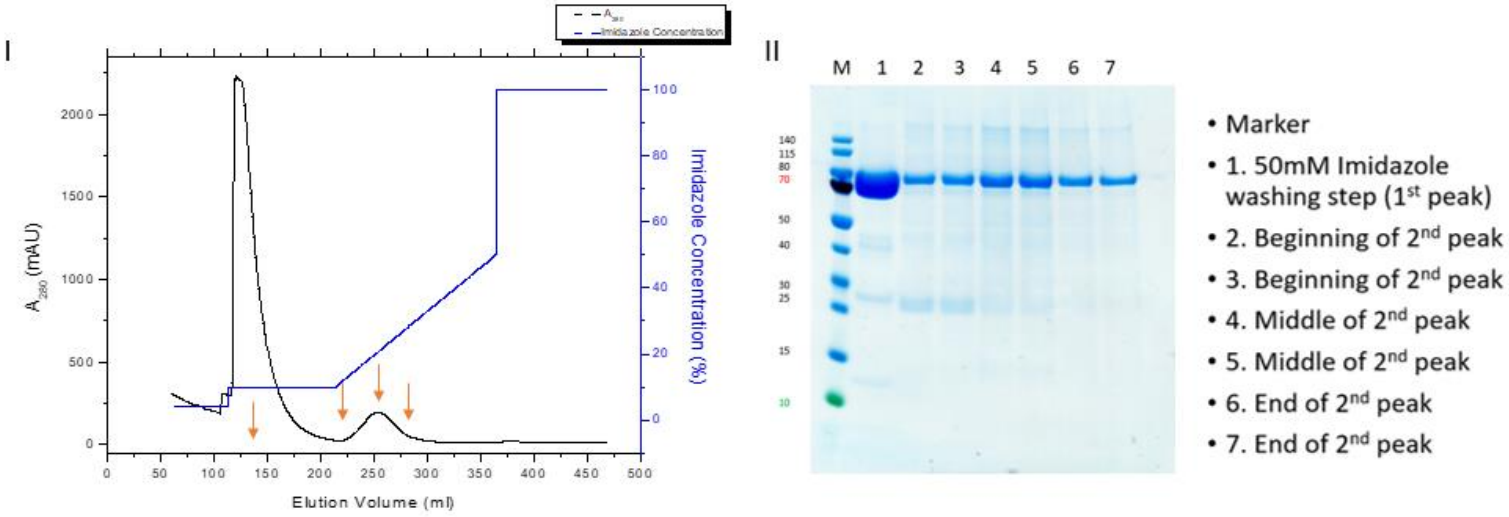
Εικόνα 16 Τεστ έκφρασης. Western Blot με αντίσωμα anti-His (1:2000 αραίωση). Marker, 0) πριν την επαγωγή της έκφρασης, 2) 2 ώρες μετά την επαγωγή, 4) 4 ώρες μετά την επαγωγή, o.n.) overnight (16-18 ώρες) μετά την επαγωγή. I) Elongation Factor G, II) Elongation Factor T, III) 27kDa Outer Membrane Protein, IV) Elongation Factor T2, V) Dihydrolipoamide Succinyltransferase, VI) Major Outer Membrane Protein.

3.7 Απομόνωση Πρωτεϊνών

Αφού βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες έκφρασης για τον κάθε στόχο, έγιναν καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (6L) για τον καθένα. Αρχικά, γίνεται χρωματογραφία συγγένειας κι έπειτα χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού όπου χρειάζεται.

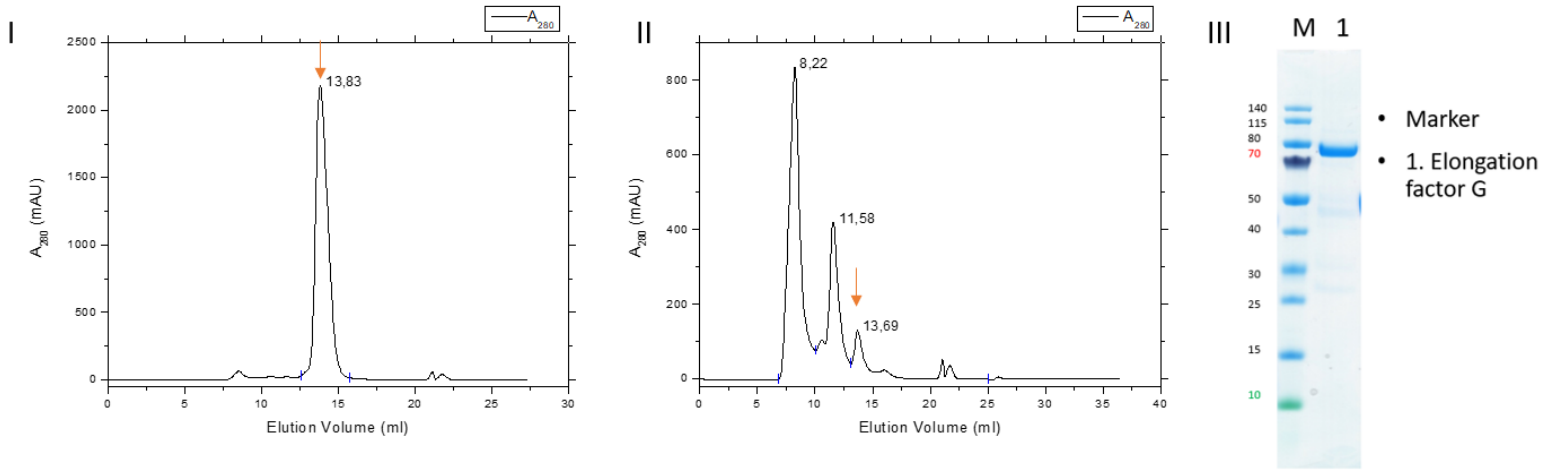
3.7.1 Elongation Factor G

Η Elongation Factor G (NCBI Accession Number 499526366) είναι μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 77 kDa. Με την χρωματογραφία συγγένειας εμφανίστηκαν δύο κορυφές, όπως φαίνεται στη Εικόνα 17. Μία μεγάλη κορυφή εμφανίστηκε κατά τη διάρκεια του πλυσίματος της στήλης με 50 mM ιμιδαζολίου και μία μικρή κορυφή εμφανίστηκε κατά την έκλουση (γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του ιμιδαζολίου από τα 50 mM μέχρι τα 250 mM) των προσδεμένων στην στήλη πρωτεϊνών. Ελέγχθηκαν και οι δύο κορυφές με SDS-PAGE όπου διαπιστώθηκε ότι και οι δύο κορυφές περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη.



Εικόνα 17 Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης Elongation Factor G. I) Χρωματογράφημα από χρωματογραφία συγγένειας με His-Trap HP 5 ml. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η συγκέντρωση του ιμιδαζολίου. II) SDS-PAGE για έλεγχο των κορυφών του χρωματογραφήματος

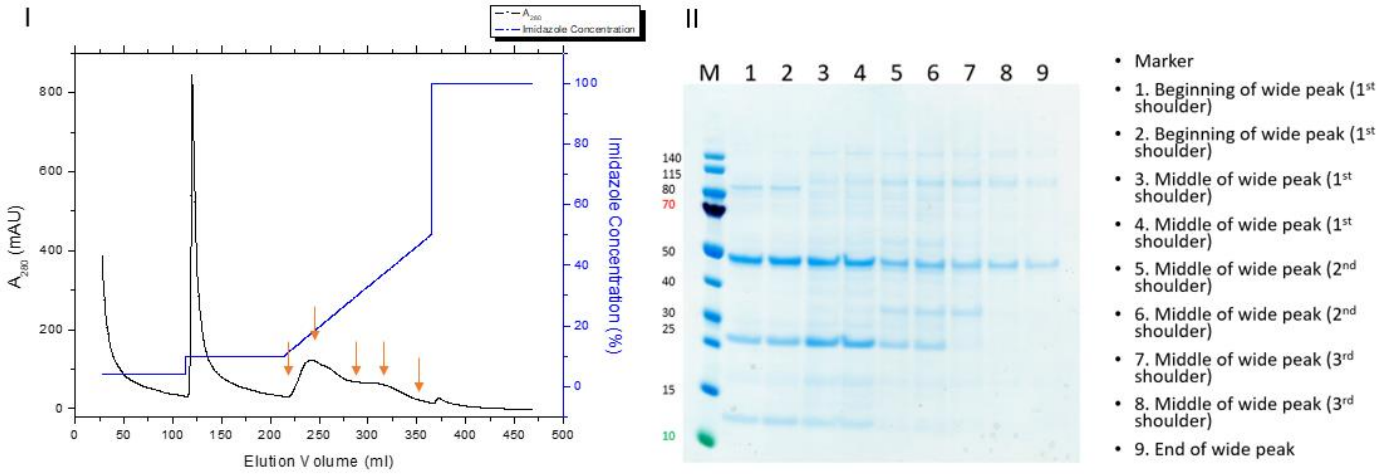
Και για τις δύο κορυφές έγινε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Για την πρώτη κορυφή (του χρωματογραφήματος συγγένειας), το χρωματογράφημα μοριακού αποκλεισμού είχε μία μεγάλη, συμμετρική κορυφή στα 13,83 ml. Για την δεύτερη κορυφή (του χρωματογραφήματος συγγένειας), το χρωματογράφημα μοριακού αποκλεισμού περιείχε τρεις συμμετρικές κορυφές. Μία μεγάλη στα 8,22 ml (πιθανώς λόγω συσσωματωμάτων), μία στα 11,58 ml και μία μικρή στα 13,69 ml. Αυτό σημαίνει ότι η πρώτη κορυφή (του χρωματογραφήματος συγγένειας) αποτελείται από ομοιογενή πληθυσμό, ενώ η δεύτερη κορυφή (του χρωματογραφήματος συγγένειας) όχι. Τα χρωματογραφήματα μοριακού αποκλεισμού φαίνονται στην Εικόνα 18.



Εικόνα 18 Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης Elongation Factor G. I) Χρωματογράφημα από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού για την 1η κορυφή του χρωματογραφήματος συγγένειας II) Χρωματογράφημα από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού για την 2η κορυφή του χρωματογραφήματος συγγένειας, III) SDS-PAGE για έλεγχο της κορυφής ενδιαφέροντος.

3.7.2 Elongation Factor T

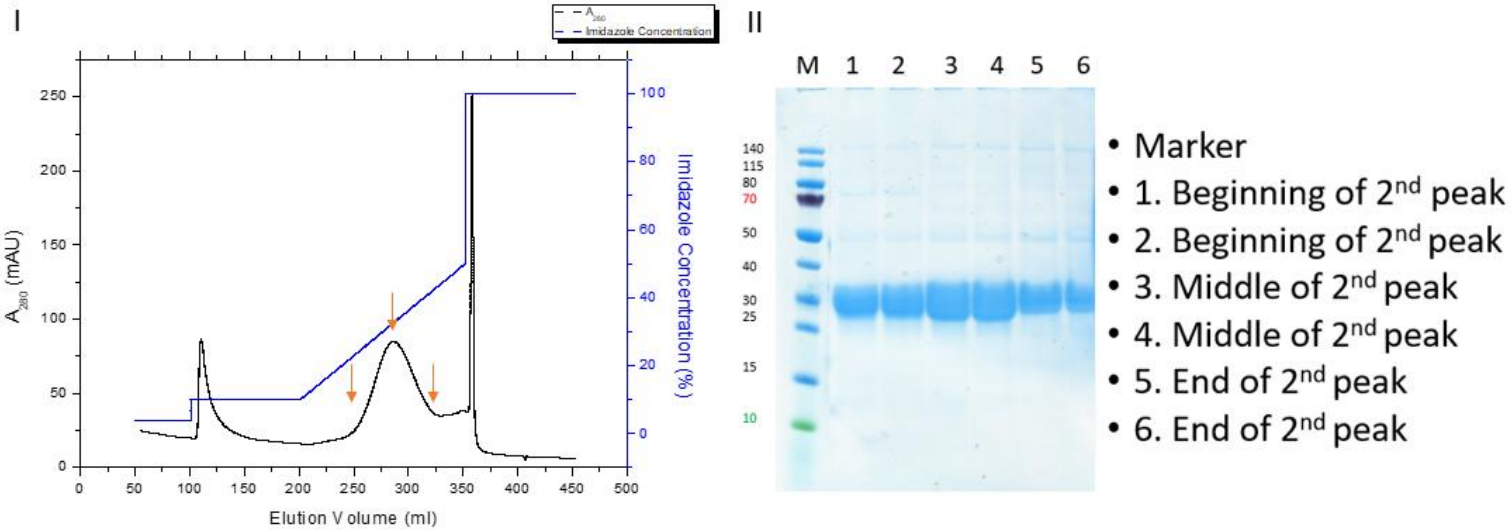
Η Elongation Factor T (NCBI Accession Number 364507070) είναι μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 43 kDa. Με την χρωματογραφία συγγένειας εμφανίστηκαν δύο κορυφές. Μία μεγάλη κορυφή εμφανίστηκε κατά τη διάρκεια του πλυσίματος της στήλης με 50 mM ιμιδαζολίου και μία μικρή πολλαπλή κορυφή εμφανίστηκε κατά την έκλουση (γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του ιμιδαζολίου από τα 50 mM μέχρι τα 250 mM) των προσδεμένων στην στήλη πρωτεϊνών. Η πρώτη κορυφή αποτελείται από προσμίξεις. Η πολλαπλή κορυφή αποτελούνταν από τρεις «ώμους». Η επιθυμητή πρωτεΐνη βρισκόταν και στους τρεις ώμους, αλλά όχι σε καθαρή μορφή. Σε όλα τα κλάσματα υπήρχαν αρκετές προσμείξεις και μάλιστα σε συγκέντρωση παρόμοια με την επιθυμητή πρωτεΐνη. Για τον συγκεκριμένο στόχο δεν έγινε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού καθώς το δείγμα περιείχε αρκετές προσμείξεις. Το χρωματογράφημα συγγένειας και το SDS-PAGE φαίνονται στην Εικόνα 19.



Εικόνα 19 Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης Elongation Factor T. I) Χρωματογράφημα από χρωματογραφία συγγένειας με His-Trap HP 5 ml. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η συγκέντρωση του ιμιδαζολίου. II) SDS-PAGE για έλεγχο των κορυφών του χρωματογραφήματος

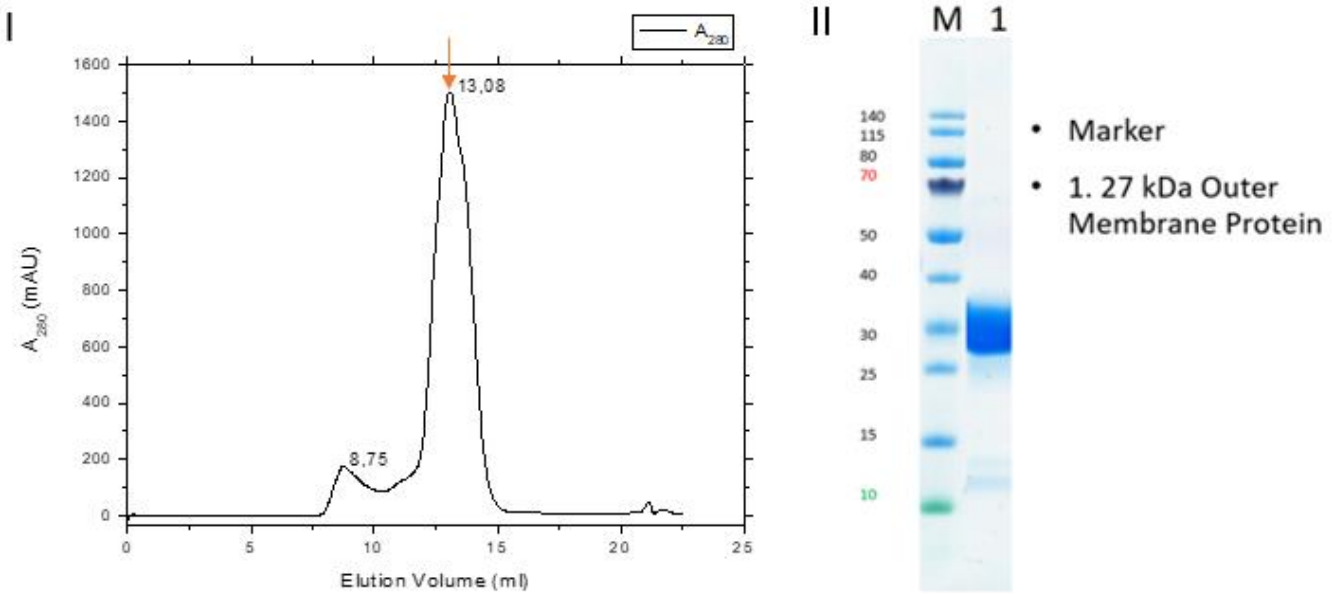
3.7.3 27 kDa Outer Membrane Protein

Η 27kDa Outer Membrane Protein (NCBI Accession Number 1004015088) είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 27 kDa. Με την χρωματογραφία συγγένειας εμφανίστηκαν τρεις κορυφές, όπως φαίνεται στην Εικόνα 20. Μία κορυφή εμφανίστηκε κατά τη διάρκεια του πλυσίματος της στήλης με 50 mM ιμιδαζολίου, μία κορυφή εμφανίστηκε κατά την έκλουση (γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του ιμιδαζολίου από τα 50 mM μέχρι τα 250 mM) των προσδεμένων στην στήλη πρωτεϊνών και μία μεγάλη κορυφή εμφανίστηκε κατά την έκλουση με 500 mM ιμιδαζολίου. Η πρώτη κορυφή αποτελείται από προσμίξεις, η δεύτερη κορυφή από την επιθυμητή πρωτεΐνη και η τρίτη κορυφή από προσμίξεις.



Εικόνα 20 Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης 27 kDa Outer Membrane Protein. I) Χρωματογράφημα από χρωματογραφία συγγένειας με His-Trap HP 5 ml. Με μπλε απεικονίζεται η συγκέντρωση του ιμιδαζολίου. II) SDS-PAGE για έλεγχο των κορυφών του χρωματογραφήματος

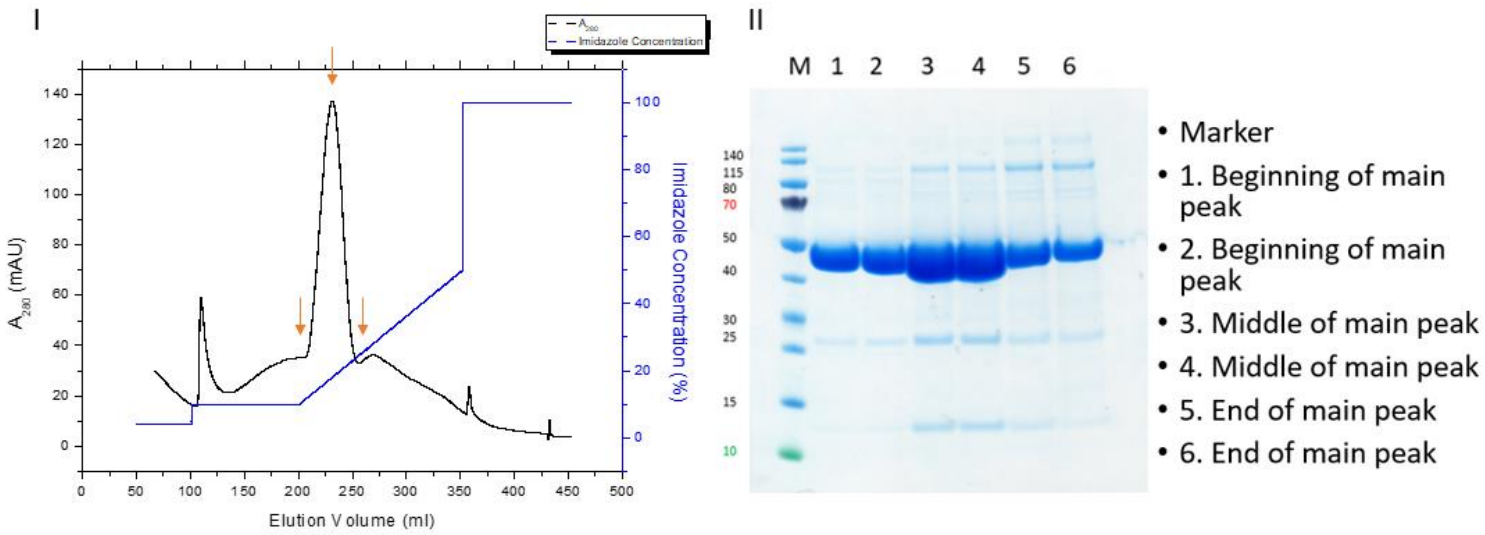
Για την κορυφή της επιθυμητής πρωτεΐνης έγινε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Το χρωματογράφημα μοριακού αποκλεισμού είχε μία μεγάλη, συμμετρική κορυφή στα 13,83 ml. Για την δεύτερη κορυφή (του χρωματογραφήματος συγγένειας), το χρωματογράφημα μοριακού αποκλεισμού περιείχε δύο κορυφές. Μία μικρή στα 8,75 ml (πιθανώς λόγω συσσωματωμάτων) και μία μεγάλη με έναν μικρό ώμο στα 13,08 ml. Τα χρωματογραφήματα και το SDS-PAGE φαίνονται στην Εικόνα 21.



Εικόνα 21 Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης 27 kDa Outer Membrane Protein. I) Χρωματογράφημα από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού για την μεσαία κορυφή του χρωματογραφήματος συγγένειας, II) SDS-PAGE για έλεγχο της επιθυμητής κορυφής

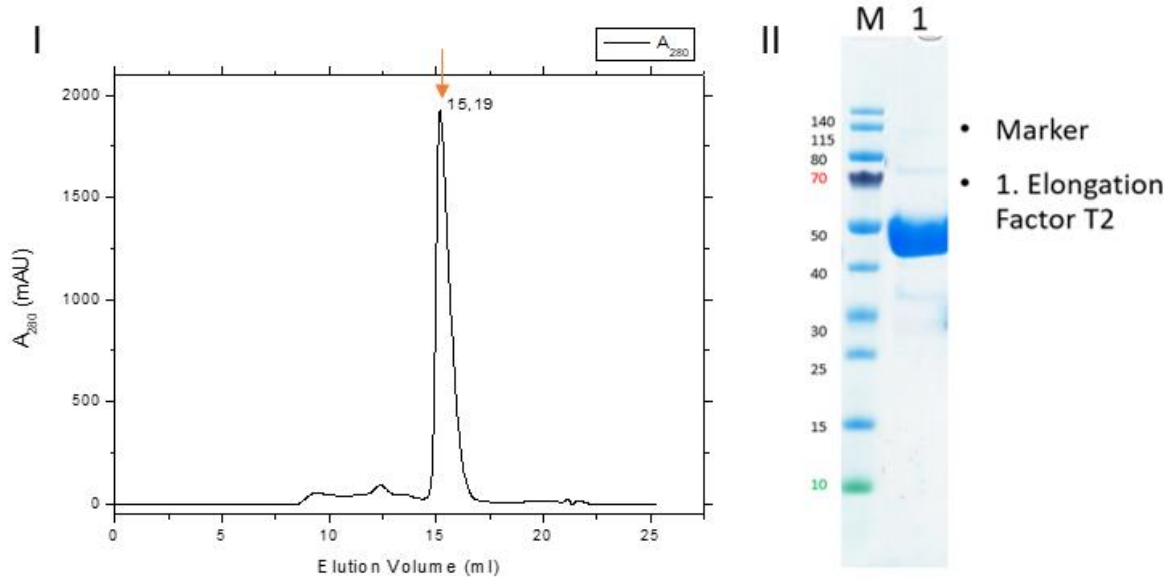
3.7.4 Elongation Factor T2

Η Elongation Factor T2 (NCBI Accession Number 364507070) είναι μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 43 kDa. Με την χρωματογραφία συγγένειας εμφανίστηκαν τέσσερις κορυφές, όπως φαίνεται στην Εικόνα 22. Μία μικρή κορυφή εμφανίστηκε κατά τη διάρκεια του πλυσίματος της στήλης με 50mM ιμιδαζολίου, μία μεγάλη κορυφή με δύο ώμους εμφανίστηκε κατά την έκλουση (γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του ιμιδαζολίου από τα 50 mM μέχρι τα 250 mM) των προσδεμένων στην στήλη πρωτεϊνών και δύο μικρές κορυφή εμφανίστηκαν κατά την έκλουση με 500 mM ιμιδαζολίου. Η πρώτη κορυφή αποτελείται από προσμίξεις, η δεύτερη κορυφή από την επιθυμητή πρωτεΐνη και οι δύο μικρές κορυφές στο τέλος αποτελούνται κι αυτές από προσμίξεις.



Εικόνα 22 Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης Elongation Factor T2. I) Χρωματογράφημα από χρωματογραφία συγγένειας με His-Trap HP 5 ml. Με μπλε απεικονίζεται η συγκέντρωση του ιμιδαζολίου. II) SDS-PAGE για έλεγχο των κορυφών του χρωματογραφήματος,

Για την κορυφή της επιθυμητής πρωτεΐνης έγινε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Το χρωματογράφημα μοριακού αποκλεισμού είχε μία μεγάλη, συμμετρική κορυφή στα 15,19 ml. Τα χρωματογραφήματα και το SDS-PAGE φαίνονται στην Εικόνα 23.

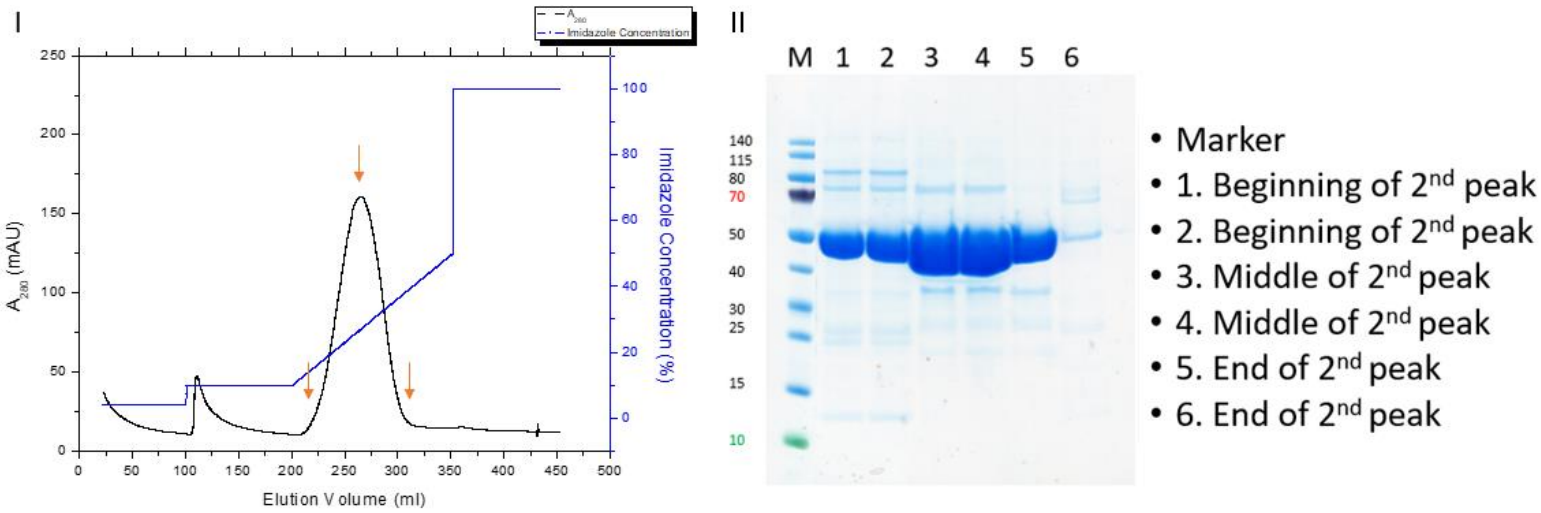


Εικόνα 23 Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης Elongation Factor T2. I) Χρωματογράφημα από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού για την μεσαία κορυφή του χρωματογραφήματος συγγένειας, II) SDS-PAGE για έλεγχο της επιθυμητής κορυφής.

3.7.5 Dihydrolipoamide Succinyltransferase

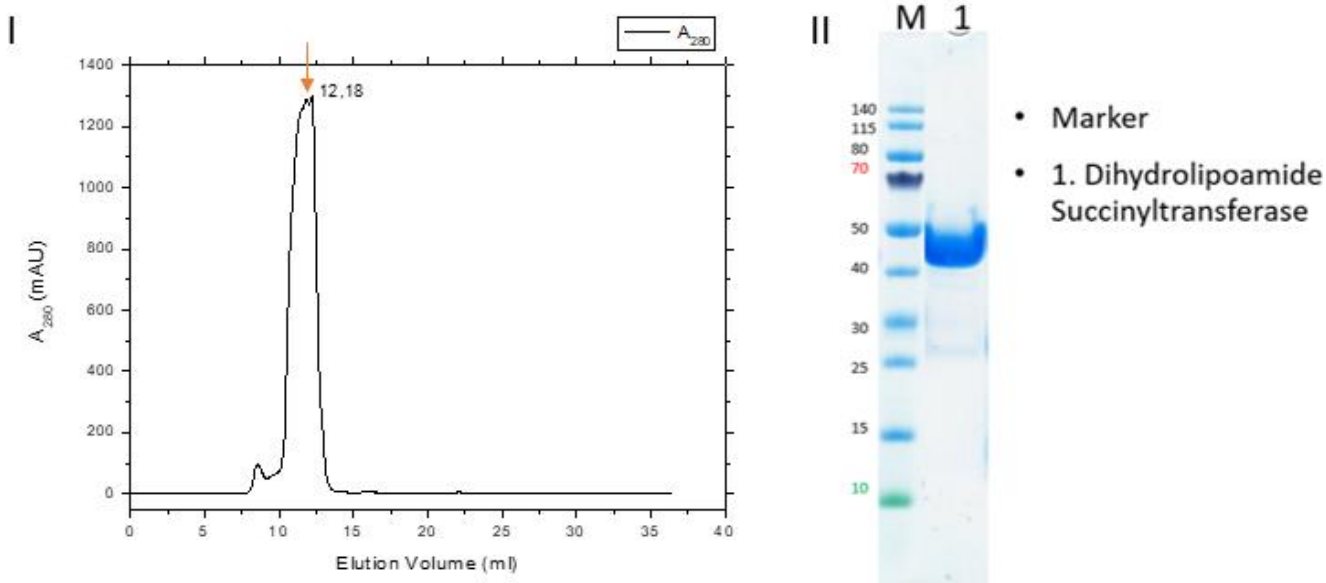
H Dihydrolipoamide Succinyltransferase (NCBI Accession Number 53750352) είναι μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 45 kDa. Στην χρωματογραφία συγγένειας εμφανίστηκαν δύο κορυφές, όπως φαίνεται στην Εικόνα

24. Μία μικρή κορυφή εμφανίστηκε κατά τη διάρκεια του πλυσίματος της στήλης με 50 mM ιμιδαζολίου και μία μεγάλη κορυφή με εμφανίστηκε κατά την έκλουση (γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης του ιμιδαζολίου από τα 50 mM μέχρι τα 250 mM) των προσδεμένων στην στήλη. Η πρώτη κορυφή αποτελείται από προσμίξεις και η δεύτερη κορυφή από την επιθυμητή.



Εικόνα 24 Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης Dihydrolipoamide Succinyltransferase. I) Χρωματογράφημα από χρωματογραφία συγγένειας με His-Trap HP 5 ml. Με μπλε απεικονίζεται η συγκέντρωση του ιμιδαζολίου. II) SDS-PAGE για έλεγχο των κορυφών του χρωματογραφήματος

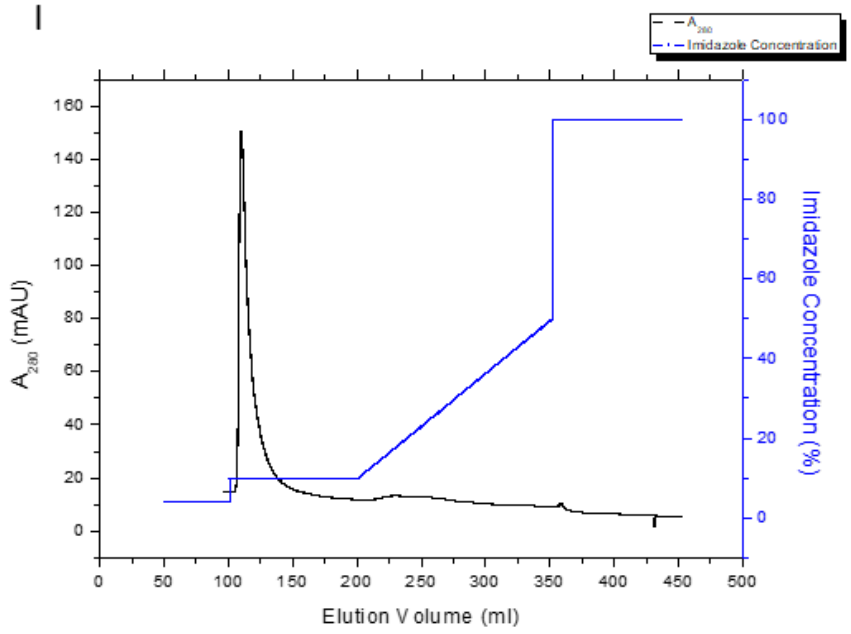
Για την κορυφή της επιθυμητής πρωτεΐνης έγινε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Το χρωματογράφημα μοριακού αποκλεισμού είχε μία μεγάλη κορυφή με έναν ώμο στα 12,18 ml. Τα χρωματογραφήματα και το SDS-PAGE φαίνονται στην Εικόνα 25.



Εικόνα 25 Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης Dihydrolipoamide Succinyltransferase. I) Χρωματογράφημα από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού για την μεσαία κορυφή του χρωματογραφήματος συγγένειας, II) SDS-PAGE για τον έλεγχο της επιθυμητής κορυφής.

3.7.6 Major Outer Membrane Protein

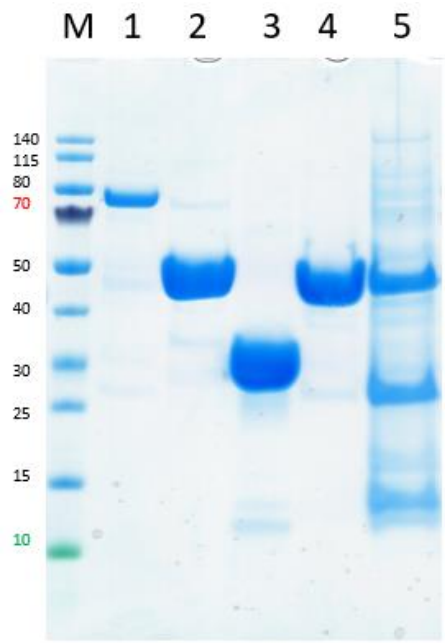
Η Major Outer Membrane Protein (NCBI Accession Number 295650544) είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 33 kDa. Με την χρωματογραφία συγγένειας εμφανίστηκε μονάχα μία κορυφή, όπως φαίνεται στην Εικόνα 26, κατά τη διάρκεια του πλυσίματος της στήλης με 50 mM ιμιδαζολίου και αποτελούνταν από προσμείξεις. Η επιθυμητή πρωτεΐνη δεν εμφανίστηκε.



Εικόνα 26 Διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης Major Outer Membrane Protein. Ι) Χρωματογράφημα από χρωματογραφία συγγένειας με His-Trap HP 5 ml. Με μπλε απεικονίζεται η συγκέντρωση του ιμιδαζολίου.

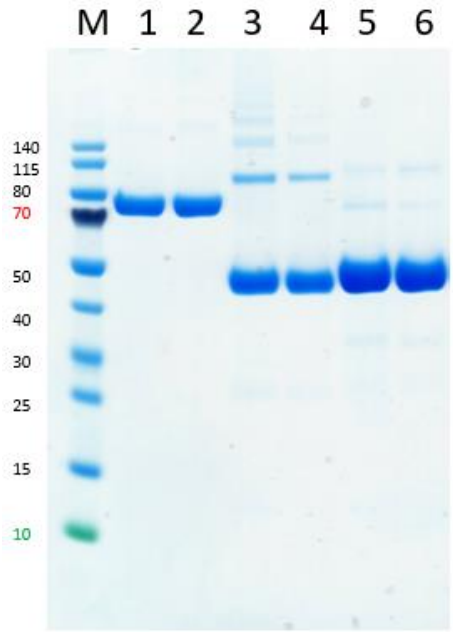
3.8 Μελέτη των καθαρών πρωτεϊνών με SDS-PAGE

Μετά την διαδικασία απομόνωσης των επιθυμητών στόχων, έγινε έλεγχος των πρωτεϊνών με SDS-PAGE. Στην Εικόνα 27 φαίνεται ότι οι απομονωμένες πρωτεΐνες ήταν αρκετά υψηλής καθαρότητας, χωρίς αξιοσημείωτες προσμείξεις, εκτός από την πρωτεΐνη Elongation Factor T, η οποία είχε πολλές. Ο Elongation Factor T και Elongation Factor T2 αποτελούν τις ίδιες πρωτεΐνες οι οποίες εκφράζονται από διαφορετικά γονίδια. Λόγω της αδυναμίας απομόνωσης του Elongation Factor T χωρίς προσμείξεις, η πρωτεΐνη αυτή δεν χρησιμοποιήθηκε για τα επόμενα πειράματα.



Εικόνα 27 SDS-PAGE με τις απομονωμένες πρωτεΐνες. Marker, 1) Elongation Factor G, 2) Dihydrolipoamide Succinyltransferase, 3) 27 kDa Outer Membrane Protein, 4) Elongation Factor T2, 5) Elongation Factor T

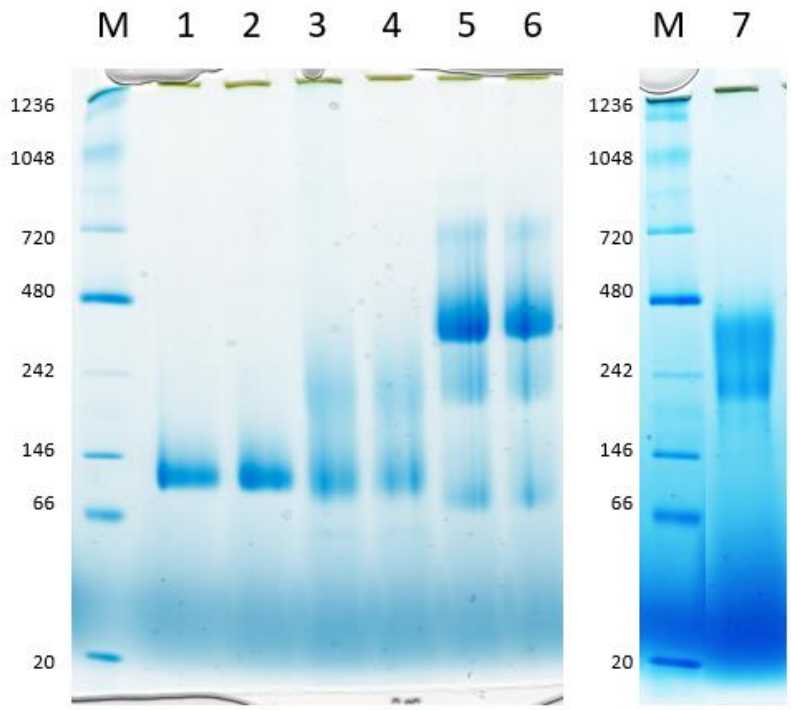
Προκειμένου να ελεγχθεί αν οι πρωτεΐνες κατά την χρωματογραφία αποκλεισμού γίνονται πιο καθαρές ή αν δεν υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά με το πριν και το μετά, έγινε SDS-PAGE με δείγματα της ίδιας πρωτεΐνης πριν και μετά την χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 28, οι πρωτεΐνες ήταν εξίσου καθαρές είτε μετά τη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού είτε πριν, άρα δεν ήταν αναγκαίο βήμα για τον καθαρισμό τους. Ο Elongation Factor T2, μετά την χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού φαίνεται να έχει λιγότερες πρωτεΐνες στα υψηλά μοριακά βάρη. Όμως, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 27, οι πρωτεΐνες αυτές «εξαφανίζονται» όταν στο πρωτεϊνικό δείγμα προστεθούν 10 mM DTT (Dithiothreitol) και το δείγμα θερμανθεί στους 90°C για 5 λεπτά. Επομένως, οι λωρίδες στα υψηλά μοριακά βάρη πιθανόν είναι διάφορες ολιγομερείς καταστάσεις του Elongation Factor T2, στον σχηματισμό των οποίων συμβάλλουν και δισουλφιδικοί δεσμοί. Στα επόμενα πειράματα δεν έγινε χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες.



Εικόνα 28 SDS-PAGE Marker, 1) Elongation Factor G μετά από χρωματογραφία συγγένειας, 2) Elongation Factor G μετά από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, 3) Elongation Factor T2 μετά από χρωματογραφία συγγένειας, 4) Elongation Factor T2 μετά από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, 5) Dihydrolipoamide Succinyltransferase μετά από χρωματογραφία συγγένειας, 6) Dihydrolipoamide Succinyltransferase μετά από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

3.9 Μελέτη των πρωτεϊνών στόχων με Native PAGE

Προκειμένου να ελεγχθούν οι πρωτεΐνες-στόχοι υπό φυσιολογικές συνθήκες (μη αποδιατακτικές) έγινε Native PAGE, το οποίο φαίνεται στην Εικόνα 29. Ο Elongation Factor G είχε μία λωρίδα στην πηκτή που σημαίνει ότι ο πληθυσμός ήταν ομοιογενής. Ο Elongation Factor T2 είχε δύο λωρίδες, που σημαίνει ότι ο πληθυσμός δεν ήταν ομοιογενής. Πιθανότατα η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έχει δύο ολιγομερείς καταστάσεις. Η Dihydrolipoamide Succinyltransferase είχε τέσσερις λωρίδες. Κατά πάσα πιθανότητα, η πρωτεΐνη αυτή έχει αρκετές ολιγομερείς καταστάσεις και ο μεγαλύτερος πληθυσμός βρίσκεται σε κάποια υψηλότερη κατάσταση μιας και η πιο έντονη λωρίδα βρίσκεται ψηλότερα από άλλες λωρίδες. Η 27 kDa Outer Membrane Protein είχε κι αυτή δύο λωρίδες, οπότε πιθανόν να έχει και δύο ολιγομερείς καταστάσεις.



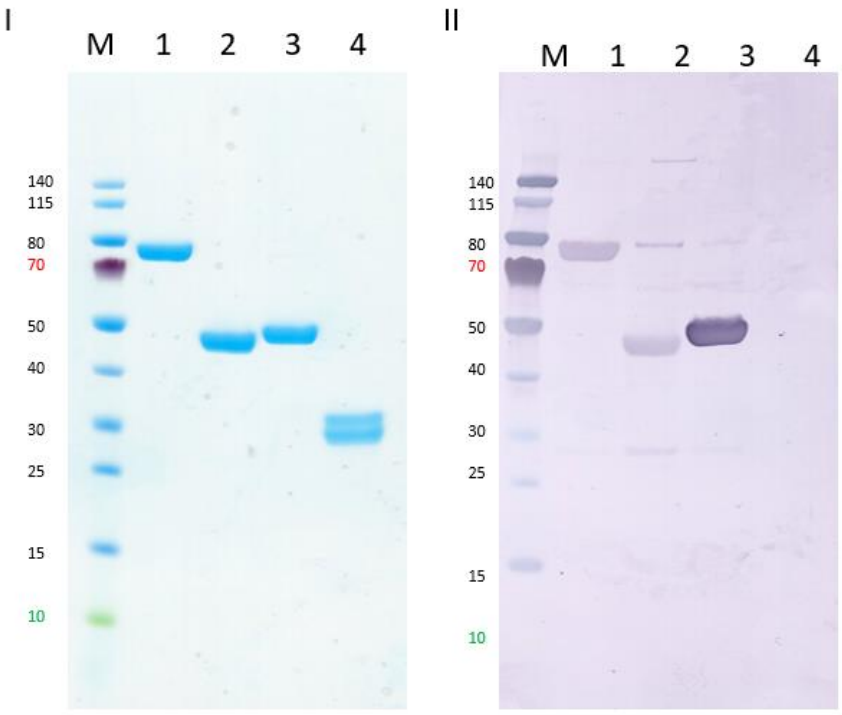
Εικόνα 29 Native PAGE. Marker, 1) Elongation Factor G μετά από χρωματογραφία συγγένειας, 2) Elongation Factor G μετά από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, 3) Elongation Factor T2 μετά από χρωματογραφία συγγένειας, 4) Elongation Factor T2 μετά από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, 5) Dihydrolipoamide Succinyltransferase μετά από χρωματογραφία συγγένειας, 6) Dihydrolipoamide Succinyltransferase μετά από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού, Marker, 7) 27 kDa Outer Membrane Protein μετά από χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.

Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα μοριακού αποκλεισμού και το Native PAGE, φαίνεται ότι για τις πρωτεΐνες που ο μεγαλύτερος πληθυσμός τους βρισκόταν σε μεγάλα μοριακά βάρη στο Native PAGE, εμφανίστηκαν και νωρίτερα από τις άλλες στα χρωματογραφήματα μοριακού αποκλεισμού. Αντίθετα, αυτές που ο κύριος πληθυσμός τους βρισκόταν σε χαμηλότερα μοριακά βάρη, εμφανίστηκαν αργότερα στο χρωματογράφημα μοριακού αποκλεισμού. Οι πρωτεΐνες που είχαν παραπάνω από μία λωρίδα στο Native PAGE, κατά πάσα πιθανότητα μπορούν να βρεθούν σε διαφορετικές ολιγομερείς καταστάσεις.

3.10 Έλεγχος αντιγονικότητας των πρωτεΐνών-στόχων με Western Blot

3.10.1 Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-στόχων με μείγμα ορών ασθενών *Legionella*

Εφόσον οι πρωτεΐνες-στόχοι κλωνοποιήθηκαν και απομονώθηκαν, έγινε έλεγχος της αντιγονικότητάς τους με Western Blot, χρησιμοποιώντας ορούς ασθενών. Για τον έλεγχο χρησιμοποιήθηκε ένα μείγμα 17 ορών από ασθενείς (1:500 αραίωση) που νόσησαν από *Legionella*.



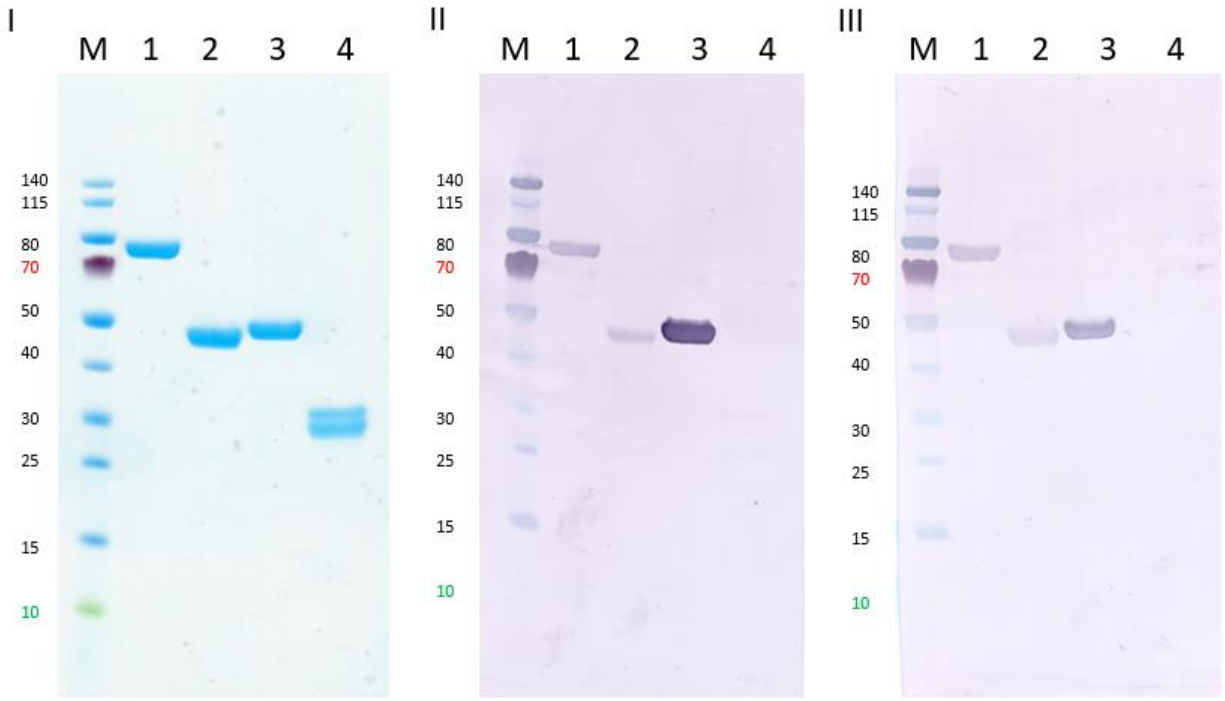
Εικόνα 30 Έλεγχος αντιγονικότητας των πρωτεϊνών-στόχων. I) SDS-PAGE με τις πρωτεΐνες-στόχους, II) Western Blot με μείγμα ορών (1:500 αραίωση) από ασθενείς Legionella. Marker, 1) Elongation Factor G, 2) Elongation Factor T2, 3) Dihydrolipoamide Succinyltransferase, 4) 27 kDa Outer Membrane Protein

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 30, οι πρωτεΐνες Elongation Factor G, Elongation Factor T2 και Dihydrolipoamide Succinyltransferase αλληλεπίδρασαν με τους ορούς, ενώ η 27 kDa Outer Membrane Protein όχι. Η Dihydrolipoamide Succinyltransferase αλληλεπίδρασε εντονότερα από τις άλλες.

3.10.2 Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-στόχων με ορούς από τον ίδιο ασθενή *Legionella* από διαφορετικούς χρόνους

Μετά από τον έλεγχο της αντιγονικότητας με το μείγμα ορών, ελέγχθηκε και η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με ορούς από τον ίδιο ασθενή οι οποίοι όμως ελήφθησαν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, προκειμένου να ελεγχθεί εάν οι πρωτεΐνες αυτές προκαλούν διαφορετική ανοσολογική απόκριση αναλόγως με την φάση της νόσου. Ο πρώτος ορός λήφθηκε κατά τη διάρκεια της νόσου και ο δεύτερος μετά την ανάρρωση. Στην Εικόνα 31 φαίνεται ότι η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Elongation Factor G και Elongation Factor T2 με τον πρώτο και το δεύτερο ορό είναι πολύ παρόμοιες, ενώ η Dihydrolipoamide Succinyltransferase αλληλεπιδρά πολύ περισσότερο με τον πρώτο ορό και λιγότερο με τον δεύτερο ορό. Αυτό ίσως σημαίνει ότι η Dihydrolipoamide Succinyltransferase προκαλεί ανοσολογική απόκριση στα

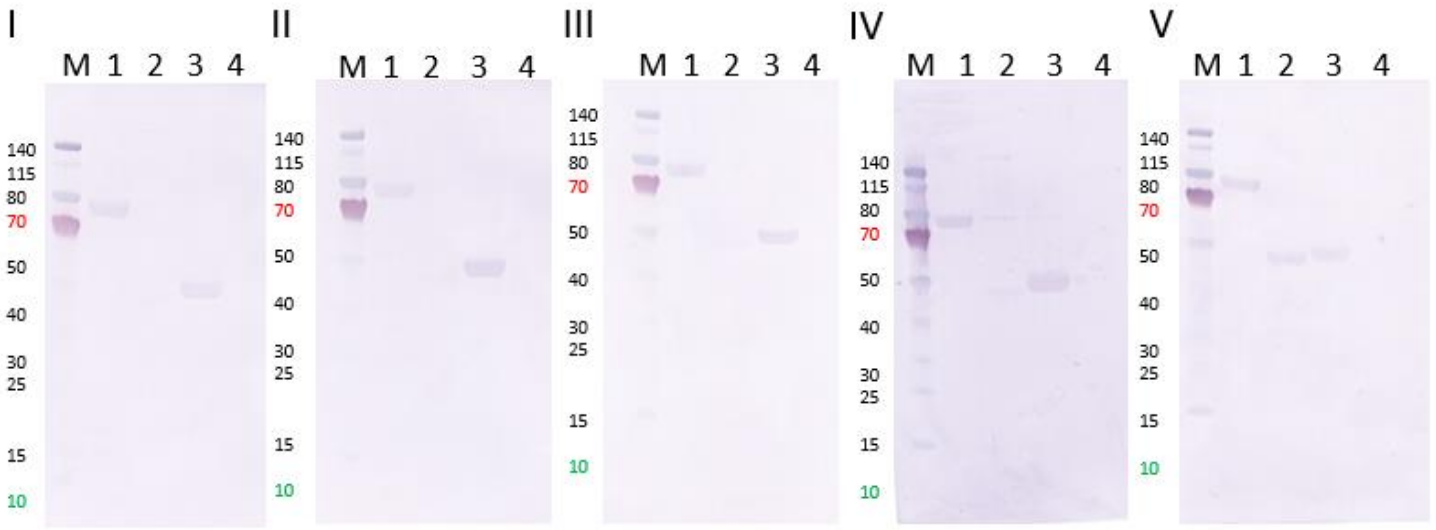
αρχικά στάδια της νόσου, όμως τα αντισώματα για την συγκεκριμένη πρωτεΐνη μειώνονται κατά πολύ μετά την ανάρρωση. Η 27 kDa Outer Membrane Protein δεν αλληλεπίδρασε με κανένα από τους δύο ορούς.



Εικόνα 31 Έλεγχος αντιγονικότητας των πρωτεϊνών-στόχων με ορούς του ίδιου ασθενή (367) σε διαφορετικές φάσεις της νόσου. I) SDS-PAGE με τις πρωτεΐνες-στόχους, II) Western Blot με τον πρώτο (367I) ορό (1:500 αραίωση), III) Western Blot με τον δεύτερο (367II) ορό (1:500 αραίωση). Marker, 1) Elongation Factor G, 2) Elongation Factor T2, 3) Dihydrolipoamide Succinyltransferase, 4) 27 kDa Outer Membrane Protein

3.10.3 Έλεγχος αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών-στόχων με ορούς από αιμοδότες (Negative controls)

Προκειμένου να ελεγχθεί αν η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών-στόχων με τους ορούς από τους ασθενείς της *Legionella* οφείλεται στην αντιγονικότητα των πρωτεϊνών ή αν είναι αποτέλεσμα κάποια άλλης αλληλεπίδρασης, έγινε έλεγχος των πρωτεϊνών αυτών με ορούς από αιμοδότες, οι οποίοι δεν είχαν νοσήσει από *Legionella* και δεν είχαν αντισώματα για το συγκεκριμένο βακτήριο.



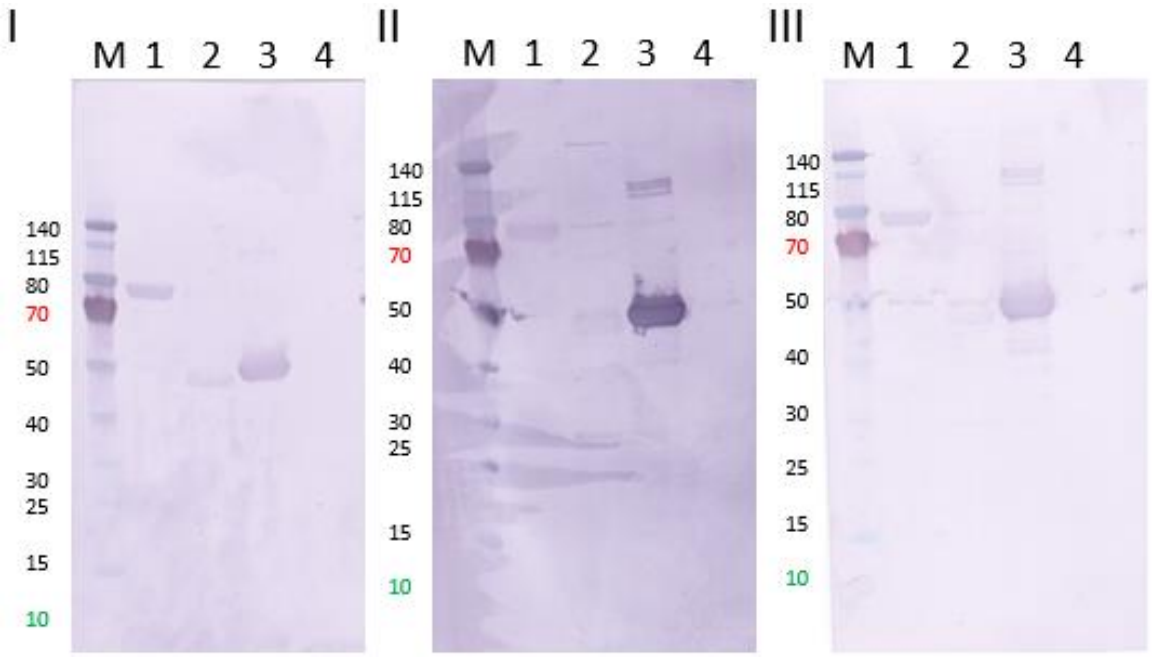
Εικόνα 32 Έλεγχος αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών-στόχων με ορούς (1:500 αραίωση) από αιμοδότες (negative controls). I) ορός 54653, II) ορός 2, III) ορός 64501, IV) ορός 2800, V)1983. Marker, 1) Elongation Factor G, 2) Elongation Factor T2, 3) Dihydrolipoamide Succinyltransferase, 4) 27 kDa Outer Membrane Protein

Στην Εικόνα 32 φαίνεται ότι η πρωτεΐνη Elongation Factor G αλληλεπίδρασε με τους ορούς από τους αιμοδότες, όπως και με τους ορούς από ασθενείς, αλλά σε λίγο μικρότερη ένταση. Η πρωτεΐνη Elongation Factor T2 δεν αλληλεπίδρασε με τους ορούς των αιμοδοτών, εκτός από μία περίπτωση (ορός 1983), στην οποία αλληλεπίδρασε, όμως σε μικρότερη ένταση απ' ότι με τους ορούς των ασθενών. Η πρωτεΐνη Dihydrolipoamide Succinyltransferase αλληλεπίδρασε με τους ορούς των αιμοδοτών, αλλά σε πολύ μικρότερη ένταση απ' ότι με τους ορούς των ασθενών. Η πρωτεΐνη 27 kDa Outer Membrane Protein δεν αλληλεπίδρασε με κανέναν ορό.

3.10.4 Έλεγχος διασταυρούμενων αλληλεπιδράσεων με την *Coxiella burnetii*

Η *Coxiella burnetii* και η *Legionella pneumophila* είναι εξελικτικά κοντινοί οργανισμοί κι έχουν αρκετές ομοιότητες. Για το λόγο αυτό, ελέγχθηκαν οι πρωτεΐνες-στόχοι για διασταυρούμενες αλληλεπιδράσεις με ορούς από ασθενείς που νόσησαν με *Coxiella burnetii*. Στην Εικόνα 33 φαίνεται ότι η πρωτεΐνη Elongation Factor G αλληλεπίδρασε με τους ορούς της ενδοκαρδίτιδας και της χρόνιας μορφής της νόσου, αλλά όχι αξιοσημείωτα με τον ορό από την οξεία μορφή της νόσου. Η πρωτεΐνη Elongation Factor T2 δεν αλληλεπίδρασε αξιοσημείωτα με κανένα από τους ορούς. Η πρωτεΐνη Dihydrolipoamide Succinyltransferase αλληλεπίδρασε μέτρια με τους ορούς από την ενδοκαρδίτιδα και την χρόνια μορφή της νόσου, αλλά αλληλεπίδρασε πολύ

ισχυρά με τον ορό της οξείας μορφής. Η 27 kDa Outer Membrane Protein δεν αλληλεπίδρασε με κανέναν από τους ορούς.



Εικόνα 33 Έλεγχος διασταυρούμενων αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών-στόχων με ορούς (1:500 αραίωση) από ασθενείς Coxiella I) ορός από ασθενή με ενδοκαρδίτιδα, II) ορός από ασθενή με οξεία μορφή της νόσου, III) ορός από ασθενή με χρόνια μορφή της νόσου. Marker, 1) Elongation Factor G, 2) Elongation Factor T2, 3) Dihydrolipoamide Succinyltransferase, 4) 27 kDa Outer Membrane Protein

3.11 Έλεγχος αντιγονικότητας πρωτεϊνών-στόχων με ELISA

Από τα Western Blot φάνηκε ότι οι πρωτεΐνες-στόχοι αλληλεπίδρασαν και με τους αιμοδότες (αρνητικοί οροί), αλλά σε καμία περίπτωση δεν αλληλεπίδρασαν τόσο ισχυρά όσο με τους ορούς των ασθενών. Για να ερευνηθεί περαιτέρω αν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες είναι αντιγονικές ή όχι, έγινε ELISA χρησιμοποιώντας τις καθαρές πρωτεΐνες με ορούς ασθενών με *Legionella*, με αιμοδότες αλλά και με ορούς ασθενών με *Coxiella*. Τα αναλυτικά αποτελέσματα της ELISA φαίνονται στο Παράρτημα (Ενότητα D).

Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι οι οροί των ασθενών της *Legionella*, αλληλεπιδρούν σε όλες τις περιπτώσεις περισσότερο από τους ορούς των αιμοδοτών, όχι όμως αξιοσημείωτα περισσότερο. Επίσης, οι οροί των ασθενών με *Coxiella* αλληλεπιδρούν λιγότερο από τους ορούς των ασθενών της *Legionella*, αλλά με μικρή διαφορά.

4. Συμπεράσματα

Η γρήγορη κι έγκυρη διάγνωση είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της νόσου των Λεγεωνάριων. Για να δημιουργηθεί αξιόπιστο και γρήγορο διαγνωστικό τεστ, είναι σημαντικό να βρεθούν πρωτεΐνες-στόχοι, οι οποίες να αλληλεπιδρούν με όλους τους ορούς με μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα.

4.1 ELISA με στελέχη και ορούς

Από την ELISA που έγινε στην αρχή της μελέτης, φάνηκε ότι ορισμένα στελέχη αλληλεπιδρούν περισσότερο με τους ορούς από κάποια άλλα, αλλά και ότι κάποιοι οροί αλληλεπιδρούν με περισσότερα στελέχη από κάποιους άλλους. Όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη ήταν *Legionella pneumophila serogroup 1*. Παρόλα αυτά, δεν συμπεριφέρθηκαν όλα με τον ίδιο τρόπο. Ίσως κάποια από αυτά να είχαν γίνει πιο λοιμογόνα από τα υπόλοιπα. Αυτό ίσως θα μπορούσε να συμβεί κάτω από συνθήκες στρες (π.χ. έλλειψη θρεπτικών συστατικών, αρκετά υψηλή ή χαμηλή θερμοκρασία, υψηλή συγκέντρωση χλωρίου κ.ά.). Ακόμα, οι οροί των ασθενών είναι αρκετά πολύπλοκα δείγματα. Δεν είναι γνωστό πόσες μέρες πριν την λήψη του ορού είχε γίνει η μόλυνση του οργανισμού και φυσικά δεν είναι γνωστό εάν παλιότερα ο οργανισμός είχε μολυνθεί από κάποιον άλλο ορότυπο/στέλεχος της *Legionella* ή από κάποιον άλλο μικροοργανισμό, ο οποίος να δίνει διασταυρούμενες αλληλεπιδράσεις. Προκειμένου να εξαχθούν περισσότερα συμπεράσματα, πρέπει να γίνει στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

4.2 Επιλογή πρωτεΐνών-στόχων

Οι πρωτεΐνες-στόχοι που επιλέχθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκαν 1) βάσει των αποτελεσμάτων από την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών οι οποίες έδωσαν σήμα στο Western Blot και 2) βάσει της βιβλιογραφίας για τις αντιγονικές πρωτεΐνες της *Coxiella burnetii*, λόγω έλλειψης αντίστοιχης βιβλιογραφίας για αντιγονικές πρωτεΐνες της *Legionella*.

4.3 Κλωνοποίηση στόχων

Για όλους τους στόχους χρησιμοποιήθηκε η ίδια διαδικασία κλωνοποίησης. Για τους στόχους που δεν ολοκληρώθηκε η κλωνοποίηση, χρειάζεται να γίνει η διαδικασία ξανά, έως ότου βρεθούν οι σωστοί τελικοί κλώνοι.

4.4 Απομόνωση πρωτεΐνών-στόχων

Από τους 6 στόχους που κλωνοποιήθηκαν επιτυχώς (Elongation Factor G, Elongation Factor T, 27 kDa Outer Membrane Protein, Elongation Factor T2, Dihydrolipoamide Succinyltransferase και Major Outer Membrane Protein) απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή οι 4 (Elongation Factor G, 27 kDa Outer Membrane Protein, Elongation Factor T2 και Dihydrolipoamide Succinyltransferase). Η Major Outer Membrane δεν εκφράστηκε. Ο Elongation Factor T εκφράστηκε από δύο διαφορετικά γονίδια, όμως μονάχα από το ένα εκφράστηκε κι απομονώθηκε σε καθαρή μορφή. Τα δύο γονίδια, θα έπρεπε να κωδικοποιούν ακριβώς την ίδια πρωτεΐνη, χωρίς κάποια διαφορά στην αμινοξική αλληλουχία. Παρόλα αυτά, ο Elongation Factor T σύμφωνα με την αλληλούχιση που έγινε στο τελικό πλασμίδιο, είχε μία μετάλλαξη σε ένα αμινοξύ. Για το λόγο αυτό, δεν έγινε προσπάθεια να απομονωθεί σε πιο καθαρή μορφή, μιας και ο Elongation Factor T2 απομονώθηκε σε πολύ καθαρή μορφή.

4.5 Έλεγχος αντιγονικότητας

Προκειμένου να ελεγχθεί η αντιγονικότητα των πρωτεΐνών-στόχων, έγινε έλεγχος της αλληλεπίδρασης των καθαρών πρωτεϊνών με μείγμα από τους ορούς των ασθενών και με ορούς από αιμοδότες (negative controls) μέσω Western Blot και ELISA.

4.5.1 Έλεγχος με Western Blot

Στα Western Blot που έγιναν, οι τρεις από τις τέσσερις πρωτεΐνες που απομονώθηκαν σε καθαρή μορφή αλληλεπίδρασαν με το μείγμα ορών από τους ασθενείς (Elongation Factor G, Elongation Factor T2 και Dihydrolipoamide Succinyltransferase). Όμως, αλληλεπίδρασαν και με τους ορούς των αιμοδοτών. Η ένταση της αλληλεπίδρασης ήταν μεγαλύτερη με τους ορούς των ασθενών, ειδικά με την πρωτεΐνη Dihydrolipoamide Succinyltransferase.

Η Dihydrolipoamide Succinyltransferase αλληλεπίδρασε ισχυρότερα από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. Επίσης, η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, αλληλεπίδρασε με τους ορούς από τον ίδιο ασθενή με διαφορετική ένταση. Με τον πρώτο ορό αλληλεπίδρασε εντονότερα. Αυτό ίσως να οφείλεται στην διαφορετική φάση της νόσου, όμως για να επιβεβαιωθεί αυτό πρέπει να γίνει διαφορετική μελέτη με πλήθος ασθενών και ορούς

που να έχουν ληφθεί κατά τη διάρκεια της νόσου και μετά την ανάρρωση από τον κάθε ασθενή.

Ακόμα, οι πρωτεΐνες (Elongation Factor G, Elongation Factor T2 και Dihydrolipoamide Succinyltransferase) αλληλεπίδρασαν με ορούς από ασθενείς που νόσησαν από *Coxiella* (οξεία, χρόνια κι ενδοκαρδίτιδα), άρα υπάρχουν διασταυρούμενες αλληλεπιδράσεις.

Από τα αποτελέσματα του Western Blot δεν μπορεί να εξαχθεί τελικό συμπέρασμα εάν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες (Elongation Factor G, Elongation Factor T2 και Dihydrolipoamide Succinyltransferase) είναι ικανές να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία διαγνωστικού τεστ ή όχι.

Η 27 kDa Outer Membrane Protein δεν αλληλεπίδρασε με κανέναν ορό, ούτε από ασθενείς, ούτε από αιμοδότες, οπότε δεν είναι αντιγονική.

4.5.2 Έλεγχος με ELISA

Λόγω της αδυναμίας να εξαχθεί τελικό συμπέρασμα από το Western Blot για το αν είναι αντιγονικές οι πρωτεΐνες-στόχοι ή όχι, έγινε ELISA με τις καθαρές πρωτεΐνες και τους ορούς από τους ασθενείς και τους αιμοδότες.

Οι καθαρές πρωτεΐνες αλληλεπίδρασαν ισχυρότερα με τους ορούς από τους ασθενείς, αλλά όχι πολύ παραπάνω. Για να εξαχθεί ένα τελικό συμπέρασμα για το αν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες είναι αντιγονικές ή όχι, πρέπει να γίνει στατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Τέλος, οι καθαρές πρωτεΐνες αλληλεπίδρασαν και με τους ορούς από ασθενείς που νόσησαν από *Coxiella*, ασθενέστερα μεν, αλλά με σχετικά μικρή διαφορά από τους ορούς της *Legionella*, επομένως σίγουρα υπάρχουν διασταυρούμενες αλληλεπιδράσεις για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες.

5. Μελλοντικοί Στόχοι

Οι μελλοντικοί στόχοι για την συγκεκριμένη έρευνα είναι η βελτιστοποίηση της ELISA με τις απομονωμένες πρωτεΐνες (έλεγχος διαφορετικών πρωτεϊνικών συγκεντρώσεων) και τους ορούς των ασθενών, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της ELISA, η κλωνοποίηση και απομόνωση των υπόλοιπων στόχων και φυσικά ο έλεγχος της αντιγονικότητάς τους με Western Blot και ELISA.

6. Βιβλιογραφία

[1] Burillo, A., Pedro-Botet, M. L., & Bouza, E. (2017). Microbiology and Epidemiology of Legionnaire's Disease. *Infectious disease clinics of North America*, *31*(1), 7–27. https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.10.002

[2] Eisenreich, W., & Heuner, K. (2016). The life stage-specific pathometabolism of legionella pneumophila. FEBS Letters, 590(21), 3868-3886. doi:10.1002/1873-3468.12326

[3] König, L., Wentrup, C., Schulz, F., Wascher, F., Escola, S., Swanson, M. S., Buchrieser, C., & Horn, M. (2019). Symbiont-Mediated Defense against Legionella pneumophila in Amoebae. *mBio*, *10*(3), e00333-19. https://doi.org/10.1128/mBio.00333-19

[4] Swart, A. L., Harrison, C. F., Eichinger, L., Steinert, M., & Hilbi, H. (2018). *Acanthamoeba* and *Dictyostelium* as Cellular Models for *Legionella* Infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *8*, 61. https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00061

[5] Fields, B. S., Benson, R. F., & Besser, R. E. (2002). Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical microbiology reviews*, *15*(3), 506–526. https://doi.org/10.1128/cmr.15.3.506-526.2002

[6] Αντωνιάδης, Α., Λεγάκης, Ν., Μαυρίδης, Α., Μανιάτης, Α. & Τσελέντης, Ι. (2000) Ιατρική Μικροβιολογία, κεφ 12, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης

[7] Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. G., Harris, J., Mallison, G. F., Martin, S. M., McDade, J. E., Shepard, C. C., & Brachman, P. S. (1977). Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *The New England journal of medicine*, *297*(22), 1189–1197. https://doi.org/10.1056/NEJM197712012972201

[8] McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. A., & Dowdle, W. R. (1977). Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *The New England journal of medicine*, *297*(22), 1197–1203. https://doi.org/10.1056/NEJM197712012972202

[9] Hilbi, H., Jarraud, S., Hartland, E., & Buchrieser, C. (2010). Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and

control. *Molecular microbiology*, *76*(1), 1–11. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07086.x

[10] Khodr, A., Kay, E., Gomez-Valero, L., Ginevra, C., Doublet, P., Buchrieser, C., & Jarraud, S. (2016). Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of legionella. Infection, Genetics and Evolution, 43, 108-122. doi:10.1016/j.meegid.2016.04.033

[11] Rolando, M., & Buchrieser, C. (2014). Legionella pneumophila type IV effectors hijack the transcription and translation machinery of the host cell. Trends in Cell Biology, 24(12), 771-778. doi:10.1016/j.tcb.2014.06.002

[12] Allgood, S. C., & Neunuebel, M. R. (2018). The recycling endosome and bacterial pathogens. Cellular Microbiology, 20(7) doi:10.1111/cmi.12857

[13] Qiu, J., & Luo, Z. -. (2017). Legionella and coxiella effectors: Strength in diversity and activity. Nature Reviews Microbiology, 15(10), 591-605. doi:10.1038/nrmicro.2017.67

[14] Misch, E. A. (2016). Legionella: Virulence factors and host response. Current Opinion in Infectious Diseases, 29(3), 280-286. doi:10.1097/QCO.0000000000000268

[15] Meir, A., Macé, K., Lukoyanova, N., Chetrit, D., Hospenthal, M. K., Redzej, A., Roy, C., & Waksman, G. (2020). Mechanism of effector capture and delivery by the type IV secretion system from Legionella pneumophila. *Nature communications*, *11*(1), 2864. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16681-z

[16] Isaac, D. T., & Isberg, R. (2014). Master manipulators: an update on Legionella pneumophila Icm/Dot translocated substrates and their host targets. *Future microbiology*, *9*(3), 343–359. https://doi.org/10.2217/fmb.13.162

[17] Ge, J., & Shao, F. (2011). Manipulation of host vesicular trafficking and innate immune defence by Legionella Dot/Icm effectors. *Cellular microbiology*, *13*(12), 1870–1880. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01710.x

[18] Molofsky, A. B., & Swanson, M. S. (2004). Differentiate to thrive: lessons from the Legionella pneumophila life cycle. *Molecular microbiology*, *53*(1), 29–40. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04129.x

[19] Bitar, D. M., Molmeret, M., & Abu Kwaik, Y. (2004). Molecular and cell biology of Legionella pneumophila. *International journal of medical microbiology : IJMM*, *293*(7-8), 519–527. https://doi.org/10.1078/1438-4221-00286

[20] Engleberg, C., Dirita, V. & Dermody, T. (2015) Legionella: παράσιτο των αμοιβάδων και των μακροφάγων. Ψαρουλάκη, Α. (Επιμ.), Schaechter's Μηχανισμοί των Μικροβιακών Ασθενειών. Πέμπτη έκδοση (σσ 249-255). Αθήνα: Παρισιανού Α. Ε.

[21] Personnic, N., Striednig, B., Lezan, E., Manske, C., Welin, A., Schmidt, A., & Hilbi, H. (2019). Quorum sensing modulates the formation of virulent Legionella persisters within infected cells. *Nature communications*, *10*(1), 5216. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13021-8

[22] Ensminger, A. W. (2016). Legionella pneumophila, armed to the hilt: Justifying the largest arsenal of effectors in the bacterial world. Current Opinion in Microbiology, 29, 74-80. doi:10.1016/j.mib.2015.11.002

[23] Dong, Y., Mu, Y., Xie, Y., Zhang, Y., Han, Y., Zhou, Y., Wang, W., Liu, Z., Wu, M., Wang, H., Pan, M., Xu, N., Xu, C. Q., Yang, M., Fan, S., Deng, H., Tan, T., Liu, X., Liu, L., Li, J., … Feng, Y. (2018). Structural basis of ubiquitin modification by the Legionella effector SdeA. *Nature*, *557*(7707), 674–678. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0146-7

[24] Fonseca, M. V., & Swanson, M. S. (2014). Nutrient salvaging and metabolism by the intracellular pathogen legionella pneumophila. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 5(FEB) doi:10.3389/fcimb.2014.00012

[25] So, E. C., Mattheis, C., Tate, E. W., Frankel, G., & Schroeder, G. N. (2015). Creating a customized intracellular niche: Subversion of host cell signaling by legionella type IV secretion system effectors. Canadian Journal of Microbiology, 61(9), 617-635. doi:10.1139/cjm-2015-0166

[26] Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D. G., & Roy, C. R. (2007). Legionella pneumophila proteins that regulate Rab1 membrane cycling. Nature, 450(7168), 365-369. doi:10.1038/nature06336

[27] Mondino, S., Schmidt, S., Rolando, M., Escoll, P., Gomez-Valero, L., & Buchrieser, C. (2020). Legionnaires' Disease: State of the Art Knowledge of Pathogenesis Mechanisms of *Legionella*. *Annual review of pathology*, *15*, 439–466. https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032742

[28] Speir, M., Vince, J. E., & Naderer, T. (2014). Programmed cell death in legionella infection. Future Microbiology, 9(1), 107-118. doi:10.2217/fmb.13.139

[29] Palusińska-Szysz, M., & Cendrowska-Pinkosz, M. (2009). Pathogenicity of the family Legionellaceae. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, *57*(4), 279–290. https://doi.org/10.1007/s00005-009-0035-8

[30] Krause, K., & Amer, A. O. (2016). Caspase Exploitation by Legionella pneumophila. *Frontiers in microbiology*, *7*, 515. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00515

[31] Marion, C. R., Dela Cruz, C. S., & Niederman, M. S. (2016). What is Legionnaires' Disease?. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *193*(4), P5–P6. https://doi.org/10.1164/rccm.1934P5

[32] Strausbaugh L. J. (1983). Legionnaires' disease. *International journal of dermatology*, *22*(4), 239–244. https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1983.tb03376.x

[33] Sharma, L., Losier, A., Tolbert, T., Dela Cruz, C. S., & Marion, C. R. (2017). Atypical Pneumonia: Updates on Legionella, Chlamydophila, and Mycoplasma Pneumonia. *Clinics in chest medicine*, *38*(1), 45–58. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2016.11.011

[34] Cunha, C. B., & Cunha, B. A. (2017). Legionnaire's Disease Since Philadelphia: Lessons Learned and Continued Progress. *Infectious disease clinics of North America*, *31*(1), 1–5. https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.10.001

[35] Kao, W. F., Wang, J. T., Sheng, W. H., & Chen, Y. C. (2019). Community-acquired Legionnaires' disease at a medical center in northern Taiwan. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, *52*(3), 465–470. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.08.018

[36] Edelstein, P. H., & Meyer, R. D. (1984). Legionnaires' disease. A review. *Chest*, *85*(1), 114–120. https://doi.org/10.1378/chest.85.1.114

[37] Ambrose, J., Hampton, L. M., Fleming-Dutra, K. E., Marten, C., McClusky, C., Perry, C., Clemmons, N. A., McCormic, Z., Peik, S., Mancuso, J., Brown, E., Kozak, N., Travis, T., Lucas, C., Fields, B., Hicks, L., & Cersovsky, S. B. (2014). Large outbreak of Legionnaires' disease and Pontiac fever at a military base. *Epidemiology and infection*, *142*(11), 2336–2346. https://doi.org/10.1017/S0950268813003440

[38] Pierre, D. M., Baron, J., Yu, V. L., & Stout, J. E. (2017). Diagnostic testing for Legionnaires' disease. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, *16*(1), 59. https://doi.org/10.1186/s12941-017-0229-6

[39] Touray, S., Newstein, M. C., Lui, J. K., Harris, M., & Knox, K. (2014). Legionella pneumophila cases in a community hospital: A 12-month retrospective review. *SAGE open medicine*, *2*, 2050312114554673. https://doi.org/10.1177/2050312114554673

[40] Gadsby, N. J., Helgason, K. O., Dickson, E. M., Mills, J. M., Lindsay, D. S., Edwards, G. F., Hanson, M. F., Templeton, K. E., ESCMID Study Group for Molecular Diagnostics, & ESCMID Study Group for Legionella Infections, Basel, Switzerland (2016). Molecular diagnosis of Legionella infections--Clinical utility of front-line screening as part of a pneumonia diagnostic algorithm. *The Journal of infection*, *72*(2), 161–170. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.10.011

[41] Mercante, J. W., & Winchell, J. M. (2015). Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clinical microbiology reviews*, *28*(1), 95–133. https://doi.org/10.1128/CMR.00029-14

[42] Carratalà, J., & Garcia-Vidal, C. (2010). An update on Legionella. *Current opinion in infectious diseases*, *23*(2), 152–157. https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328336835b

[43] Garcia-Vidal, C., & Carratalà, J. (2006). Current clinical management of Legionnaires' disease. *Expert review of anti-infective therapy*, *4*(6), 995–1004. https://doi.org/10.1586/14787210.4.6.995

[44] Mykietiuk, A., Carratalà, J., Fernández-Sabé, N., Dorca, J., Verdaguer, R., Manresa, F., & Gudiol, F. (2005). Clinical outcomes for hospitalized patients with Legionella pneumonia in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *40*(6), 794–799. https://doi.org/10.1086/428059

[45] Blázquez Garrido, R. M., Espinosa Parra, F. J., Alemany Francés, L., Ramos Guevara, R. M., Sánchez-Nieto, J. M., Segovia Hernández, M., Serrano Martínez, J. A., & Huerta, F. H. (2005). Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires disease: levofloxacin versus macrolides. *Clinical infectious*

diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, *40*(6), 800–806. https://doi.org/10.1086/428049

[46] Varner, T. R., Bookstaver, P. B., Rudisill, C. N., & Albrecht, H. (2011). Role of rifampin-based combination therapy for severe community-acquired Legionella pneumophila pneumonia. *The Annals of pharmacotherapy*, *45*(7-8), 967–976. https://doi.org/10.1345/aph.1Q074

[47] Grau, S., Antonio, J. M., Ribes, E., Salvadó, M., Garcés, J. M., & Garau, J. (2006). Impact of rifampicin addition to clarithromycin in Legionella pneumophila pneumonia. *International journal of antimicrobial agents*, *28*(3), 249–252. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.03.029

[48] Chaplin D. D. (2010). Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *125*(2 Suppl 2), S3–S23. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980

[49] Goldsby, R., Kindt, T., Osborne, B., Kuby, J., (2013) Ανοσολογία Γαϊτανάκη, Α., Μπαξεβάνης, Κ. (Επιμ.) (σσ 73-93). Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης

[50] Kubori, T., Koike, M., Bui, X. T., Higaki, S., Aizawa, S. -., & Nagai, H. (2014). Native structure of a type IV secretion system core complex essential for legionella pathogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(32), 11804-11809. doi:10.1073/pnas.1404506111

[51] Elverdal, P. L., Svarrer, C. W., Jørgensen, C. S., Skovsted, I. C., & Uldum, S. A. (2011). Development and validation of ELISA for detection of antibodies to Legionella pneumophila serogroup 1, 3 and 6 in human sera. Journal of microbiological methods, 86(3), 298–303. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.05.022

[52] Sun, H., Ma, H., Liu, L., Cao, X., & Yang, Z. (2015). A new ELISA method for serological diagnosis of Legionella pneumophila: use of five purified proteins, FLA, MOMP, MIP, IP, and PILE, as diagnostic antigen. Clinical laboratory, 61(3-4), 275–282. https://doi.org/10.7754/clin.lab.2014.140908

[53] NebioCalculator https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation

[54] Multalin Sequence Alignment http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/

[55] Free Primer Design Tool – In-Fusion Cloning, Takara Bio https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools

[56] Reverse Complement https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

[57] Gerlach, C., Škultéty, Ľ., Henning, K., Neubauer, H., & Mertens, K. (2017). Coxiella burnetii immunogenic proteins as a basis for new Q fever diagnostic and vaccine development. Acta virologica, 61(3), 377–390. https://doi.org/10.4149/av_2017_320

Παράρτημα

Α. Δεδομένα (A_{450}) από την ELISA με τα στελέχη και τους ορούς ασθενών της *Legionella*

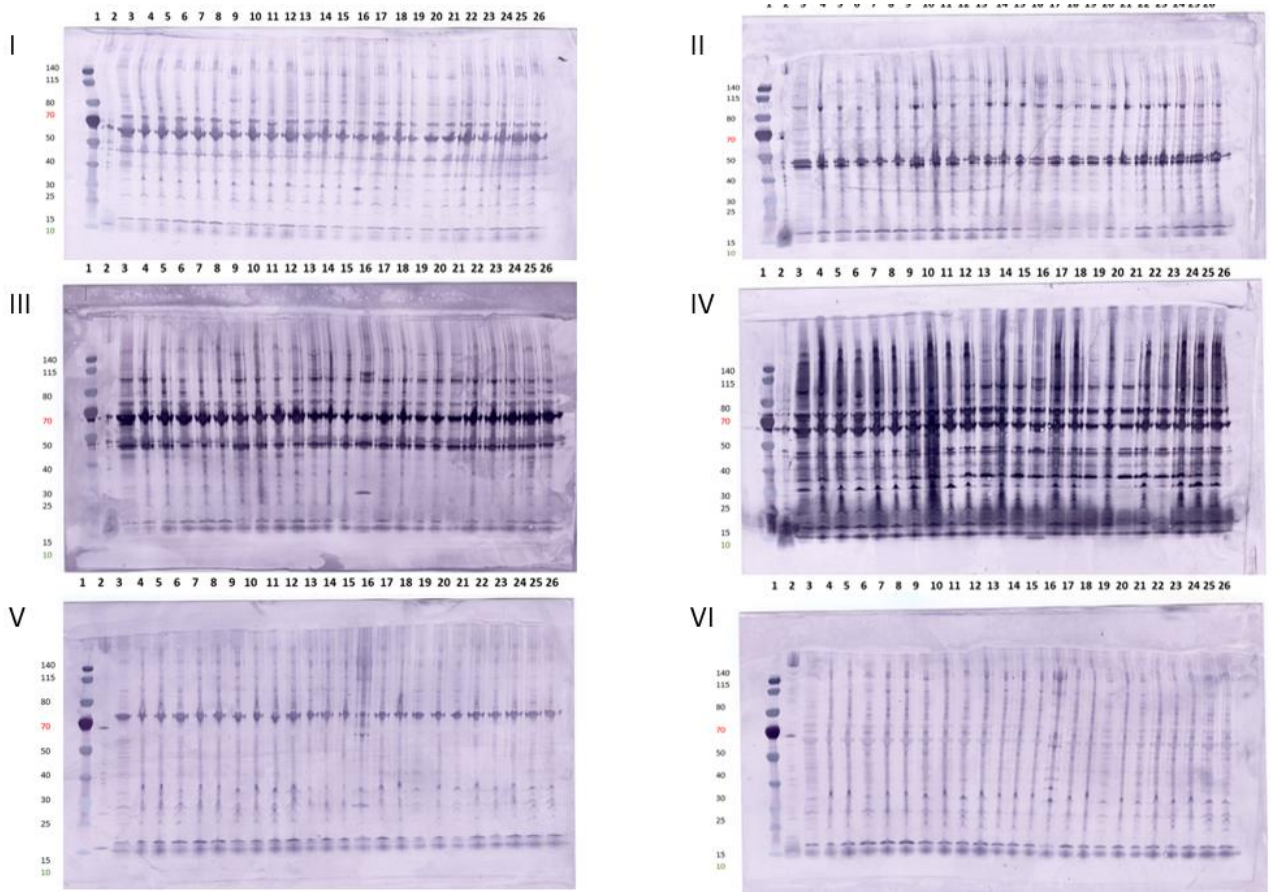
patient code	IFA old	IFA new		isolate code																
			1204	15042	15044	15082	15360	15318	15426	15491	15572	16232	16700	17284	17440	17536	17549	17664	17691	9961	10253
37	960	480	0,656	0,384	0,324	0,298	0,488	0,409	0,5	0,45	0,379	0,536	0,464	0,916	0,989	0,743	0,554	0,51	0,545	0,622	0,65
231	3840	0	1,435	0,547	0,599	0,547	0,683	0,606	0,768	0,704	0,614	1,193	1,023	1,707	1,872	1,189	0,958	0,816	0,942	1,345	0,891
257	960	0	0,412	0,313	0,355	0,431	0,505	0,432	0,66	0,399	0,348	0,33	0,494	0,457	0,436	0,985	0,343	0,354	0,367	0,313	0,331
5	960	240	1,321	0,488	0,553	0,678	0,674	0,61	0,913	0,497	0,711	1,147	0,921	1,82	1,887	1,392	1,121	0,949	0,998	1,148	0,954
54	960	0	0,882	0,354	0,289	0,388	0,419	0,326	0,41	0,369	0,375	0,311	0,32	0,413	0,503	0,76	0,307	0,316	0,363	0,252	0,236
27	960	240	0,676	0,556	0,576	0,392	0,731	0,604	0,755	0,498	0,591	0,6	1,563	1,018	0,933	0,986	0,698	0,672	0,778	0,679	0,876
17	1920	960	0,877	0,585	0,714	0,532	0,668	0,536	0,709	0,433	0,63	0,639	0,984	0,859	0,983	1,328	0,581	0,489	0,534	0,6	0,538
450	30720	960	1,352	0,649	0,782	0,643	0,827	0,637	0,782	0,594	0,78	0,661	0,906	0,962	1,227	2,084	0,605	0,516	0,478	0,705	0,522
334	960	480	0,796	0,587	0,603	0,43	0,553	0,611	0,84	0,569	0,84	0,661	0,743	0,968	1,066	0,963	0,583	0,557	0,606	0,647	0,605
64	960	0	1,319	0,89	0,841	0,689	1,251	0,875	1,432	0,765	1,113	1,06	1,215	1,536	1,472	1,164	1,01	0,983	0,925	1,66	1,067
53	3840	0	0,534	0,876	0,573	0,763	0,957	0,79	0,934	0,638	1,211	0,477	1,18	0,753	0,76	0,968	0,616	0,519	0,68	0,612	0,648
103	960	240	0,884	0,559	0,508	0,605	0,605	0,685	0,477	0,741	0,513	0,812	0,778	1,296	1,478	1,519	0,694	0,686	0,83	0,762	0,617
96	7680	960	2,399	1,047	0,868	0,44	1,995	1,509	1,331	0,919	1,152	1,614	1,687	2,421	2,528	1,331	1,565	1,386	1,436	1,659	2,599
303	960	240	0,625	0,233	0,215	0,322	0,485	0,234	0,282	0,22	0,407	0,221	0,634	0,368	0,468	0,642	0,279	0,268	0,296	0,244	0,228
324	960		0,596	0,244	0,329	0,401	0,491	0,422	0,377	0,332	0,345	0,317	1,135	0,479	0,586	0,848	0,349	0,339	0,372	0,283	0,29
339	960	960	1,063	0,632	0,597	0,774	0,727	0,801	0,965	0,542	1,047	0,991	2,806	1,267	1,637	2,215	0,849	0,831	0,993	0,801	0,955
14	960		0,915	0,609	0,632	0,857	0,872	0,799	1,019	0,517	0,987	0,969	2,967	1,163	1,637	2,165	1,033	0,788	0,999	0,781	1,123
15	1920	480	0,382	0,345	0,308	0,383	0,336	0,375	0,332	0,313	0,367	0,484	0,404	0,721	1,12	0,697	0,363	0,419	0,396	0,409	0,37
514	960	960	0,629	0,578	0,579	0,428	0,68	0,493	0,819	0,446	0,713	0,483	0,448	0,753	0,658	0,846	0,526	0,48	0,584	0,642	0,681
207	7680	480	0,425	0,6	0,628	0,395	0,606	0,59	0,615	0,474	0,676	0,462	0,987	0,682	0,778	0,969	0,425	0,37	0,391	0,451	0,495
1566	960	960	0,917	0,799	0,743	0,478	0,911	0,976	0,898	0,806	1,068	0,668	1,44	0,916	1,015	0,923	0,659	0,636	0,643	0,678	0,769
74	3840	0	0,526	0,599	0,488	0,687	0,656	0,652	0,62	0,571	0,671	0,495	0,647	0,736	0,852	1,292	0,431	0,413	0,488	0,474	0,372
321	512		0,839	0,791	0,587	0,772	1,013	0,883	1,135	0,645	0,919	1,27	1,25	1,509	1,603	1,366	1,447	1,513	1,367	1,34	1,412
negative serum no protein				0,31								0,069	0,075	0,054	0,074	0,1	0,109	0,095	0,117		
blocking with protein				0,185				0,218													
negative serum with protein				0,256				0,426													
negative serum with protein				0,381				0,426													
positive serum without protein								0,538													
blocking without protein																				0,062	

patient code	IFA old	IFA new	10032	14279	11452	11494	423	72097	5502	6299	6685	7107	6991	6826	6635	7021	7027	745	9803	12200
			0,597	0,622	0,503	0,435	0,563	0,559	0,48	0,519	0,501	0,171	0,469	0,647	0,577	0,443	0,537	0,619	0,477	0,946
37	960	480	1,179	1,03	0,897	0,681	1,199	0,896	0,912	0,795	0,817	0,528	0,993	0,854	1,064	0,806	0,787	0,984	1,158	1,723
231	3840	0	0,313	0,351	0,302	0,257	0,318	0,274	0,27	0,296	0,282	0,3	0,364	0,347	0,324	0,245	0,304	0,311	0,255	0,32
257	960	0	1,056	0,872	0,969	0,763	1,061	0,998	0,788	0,854	0,879	0,652	0,74	0,661	0,698	0,888	0,688	0,731	1,019	1,566
5	960	240	0,269	1,024	0,249	0,234	0,282	0,75	0,249	0,265	0,254	0,247	0,213	0,271	0,231	0,225	0,28	0,263	0,272	0,333
54	960	0	0,65	0,846	0,667	0,55	0,688	1,272	0,674	0,924	0,529	0,528	0,709	0,672	0,607	0,629	0,656	0,694	0,637	0,798
27	960	240	0,497	0,497	0,579	0,554	0,6	0,547	0,377	0,588	0,501	0,533	0,593	0,499	0,47	0,497	0,516	0,603	0,709	0,958
17	1920	960	0,578	0,423	0,542	0,505	0,688	0,48	0,369	0,936	0,564	0,726	0,613	0,378	0,591	0,451	0,437	0,632	0,715	0,995
450	30720	960	0,688	0,039	0,566	0,527	0,634	0,589	0,535	0,515	0,554	0,289	0,617	0,647	0,534	0,514	0,573	0,674	0,637	1,004
334	960	480	1,096	1,51	1,032	0,879	1,269	1,09	0,948	0,801	1,004	0,643	1,204	1,266	1,107	0,964	1,292	1,392	1,353	1,664
64	960	0	0,573	0,667	0,517	0,476	0,552	0,56	0,472	0,441	0,552	0,362	0,493	0,545	0,479	0,438	0,588	0,502	0,502	0,57
53	3840	0	0,591	0,6	0,72	0,56	0,789	0,707	0,538	0,815	0,646	0,519	0,465	0,469	0,502	0,568	0,515	0,575	0,745	1,325
103	960	240	1,809	2,021	1,696	1,378	1,786	1,554	1,431	1,794	2,072	0,468	2,005	1,953	1,858	1,392	1,708	2,457	1,264	1,921
96	7680	960	0,225	0,21	0,239	0,215	0,248	0,04	0,171	0,182	0,189	0,212	0,219	0,237	0,194	0,194	0,177	0,194	0,212	0,314
303	960	240	0,275	0,289	0,333	0,24	0,381	0,555	0,259	0,256	0,259	0,286	0,262	0,279	0,282	0,29	2,38	0,254	0,297	0,461
324	960		0,744	0,789	0,794	0,677	0,76	0,812	1,016	0,881	0,932	0,515	1,233	1,107	0,845	1,052	0,894	1,019	1,155	1,41
339	960	960	0,803	0,888	0,886	0,81	0,947	0,869	0,666	0,791	0,786	0,544	1,81	1,133	0,832	1,025	0,891	1,016	1,145	1,381
14	960		0,314	0,301	0,35	0,29	0,403	0,326	0,27	0,332	0,371	0,437	0,409	0,224	0,278	0,294	0,27	0,267	0,384	0,592
15	1920	480	0,589	0,646	0,621	0,556	0,567	0,646	0,73	0,463	0,563	0,277	0,561	0,551	0,6	0,457	0,768	0,658	0,536	0,589
514	960	960	0,646	0,816	0,483	0,64	0,424	0,415	0,463	0,452	0,39	0,51	0,474	0,618	0,446	0,425	0,491	0,538	0,455	0,603
207	7680	480	0,702	0,844	0,589	0,606	0,624	0,709	0,73	0,671	0,678	0,357	0,816	0,874	0,768	0,758	0,86	0,853	0,802	0,915
1566	960	960	0,439	0,441	0,429	0,333	0,507	0,422	0,366	0,465	1,348	0,301	0,35	0,312	0,366	0,411	0,415	0,416	0,611	0,73
74	3840	0	1,43	1,189	1,435	1,021	1,604	1,353	1,795	1,539	1,276	0,763	1,081	0,661	0,998	1,153	0,974	1,356	1,42	1,711
321	512																			
negative serum no protein											0,15				0,09				0,093	
blocking with protein			0,308				0,432					0,237		0,277				0,341		
negative serum with protein																				
negative serum with protein									0,336				0,089				0,179			
positive serum without protein					0,148											0,067				0,084
blocking without protein																				

patient code	IFA old	IFA new	8280	6377	6304	6645	5898	4273	72605	6091	HESSE	JETTEN	Lp ATCC	10032
			0,834	0,747	0,721	1,254	0,666	0,801	0,877	0,991	0,814	0,997	0,596	0,608
37	960	480	0,871	0,732	0,788	0,825	0,484	1,092	0,887	1,47	1,078	1,307	1,197	1,127
231	3840	0	0,413	0,425	0,402	1,053	0,449	0,611	0,447	0,601	0,418	0,45	0,453	0,387
257	960	0	0,639	0,62	1,16	0,731	0,711	1,065	0,763	1,22	1,231	2,257	2,241	1,295
5	960	240	0,294	0,293	0,297	0,322	0,286	0,468	0,323	0,413	0,34	0,415	0,515	0,331
54	960	0	0,854	0,646	0,756	2,421	0,842	1,201	0,836	1,098	0,93	0,897	0,759	0,88
27	960	240	0,521	0,653	0,562	0,564	0,566	1,172	0,507	0,889	0,742	1,001	0,725	0,736
17	1920	960	0,382	0,382	1,075	0,876	0,491	0,909	0,44	0,826	0,652	1,22	0,635	0,783
450	30720	960	0,664	0,76	0,768	0,732	0,836	1,151	0,917	1,055	0,906	1,234	0,573	0,096
334	960	480	1,261	1,291	1,283	2,187	1,262	1,984	1,449	1,808	1,48	1,925	0,918	1,174
64	960	0	1,018	0,919	1,218	2,565	0,857	1,008	0,95	1,131	1,023	0,985	0,558	0,719
53	3840	0	0,502	0,552	0,809	0,889	0,633	0,825	0,525	0,93	0,81	1,505	0,547	1,101
103	960	240	2,464	2,68	2,276	2,574	2,074	2,236	2,604	2,661	2,44	2,107	1,893	2,133
96	7680	960	0,237	0,269	0,252	0,268	0,259	0,306	0,304	0,351	0,292	0,331	0,502	0,555
303	960	240	0,395	0,395	0,802	0,377	0,338	0,366	0,34	0,465	0,392	0,486	0,579	0,804
324	960		1,194	1,563	1,149	1,318	1,113	1,319	1,273	1,572	1,352	1,51	1,403	1,689
339	960	960	1,015	1,362	0,896	1,135	0,972	1,294	1,04	1,422	1,112	1,343	1,7	1,844
14	960		0,259	0,307	0,294	0,303	0,338	0,361	0,336	0,438	0,43	0,471	0,629	0,584
15	1920	480	0,679	0,61	0,664	0,676	0,719	0,921	0,724	1,021	0,854	0,856	0,459	0,751
514	960	960	0,703	0,594	0,83	0,626	0,627	1	0,684	0,842	0,745	0,809	1,042	1,154
207	7680	480	1,063	1,063	0,919	1,095	1,186	1,412	1,235	1,391	1,123	1,09	0,725	0,897
1566	960	960	0,395	0,388	0,602	0,424	0,424	0,683	0,457	0,719	0,573	0,853	0,756	0,814
74	3840	0	1,532	0,913	1,542	0,97	0,95	1,434	0,903	1,468	1,662	2,403	0,606	1,409
321	512													
negative serum no protein				0,07				0,073				0,092		
blocking with protein					0,43				0,382				0,984	1,131
negative serum with protein														
negative serum with protein						0,207				0,089			0,287	0,422
positive serum without protein			0,071				0,08				0,089			
blocking without protein														

Εικόνα 34 Αποτελέσματα (A_{450}) της ELISA με τα στελέχη και τους ορούς. Το πορτοκαλί χρώμα αντιπροσωπεύει τις τιμές A_{450} που ήταν μεγαλύτερες από την τιμή 1 και τα γκρι για τιμές κοντά στην τιμή 1. Πορτοκαλί για $A_{450} > 1$, γκρι για $A_{450} \sim 1$.

B. Western Blots των στελεχών με τους ορούς ασθενών της *Legionella*



Εικόνα 35. Western Blots με ορούς και 25 στελέχη. I) Ορός 64 (1:500 αραίωση), II) Ορός 321 (1:500 αραίωση), III) Ορός 339 (1:500 αραίωση), IV) Ορός 367I (1:500 αραίωση), V) Ορός 303 (1:500 αραίωση), VI) Ορός 27 (1:500 αραίωση). 1) Marker, 2) LpATTC, 3) 1204, 4) Hesse, 5) Jetten, 6) 16232, 7) 17284, 8) 17440, 9) 6991, 10) 745, 11) 9803, 12) 12200, 13) 8280, 14) 6304, 15) 6645, 16) 4273, 17) 6091, 18) 10032, 19) 72605, 20) 5898, 21) 6377, 22) 7021, 23) 6826, 24) 6635, 25) 9961, 26) 17549

C. Λίστα Εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την μελέτη

Όνομα Εκκινητή	Αλληλουχία Εκκινητή (5'→3')
lpg0326_F	ATAGAAGCATAGCGCTTGGAATGCGGTGGATAG
lpg0326_R	CCTTCGCTGTACCACCATATTTCTTCGCCATAATCG
lpg2025_F	GTTCATAATAATCCCGCTGTTCCATAACTGCTC
lpg2025_R	CAGCTCGGGTGATAGTTTCCACCAAATAATCTG
lpg0314_F	CGAGTCCAGTTGTGGGCACCATGTAATATAAATTAG
lpg0314_R	TTTCATATTTACTTGTAGTTGGCAGGCCAGGAG
lpg1841_F	ATTATTGGAGTGTTGGGTGACAGAGTTGATTGAG
lpg1841_R	CTAGGGTGCGTTAGGCAACAGAAATTTGTTATAC
lpg0695_F	TGCGATATGTTTAGTTTAGGTCCTTCGTTTCTCTG
lpg0695_R	TGATTTAGAAGAGGCATTTCATCGTCTGTCACTTG
lpg2510_F	ACTTATAGTCAGAACACTAGCATAGGGTGATGAAC
lpg2510_R	TTTGCTTGATTACACATACGCCTCAACACAAC
lpg2511_F	AAACACGGTTGTGTTGAGGCGTATGTGTAATCAAG
lpg2511_R	GCTATCAAGTTATATTGTATGCCCAAGGGTGTCTG
lpg0327_F	CCACTTGCAGAGATGTTTGGTTATTCAACTGACTTAC
lpg0327_R	CTTGCATCTTTATTTACATGCGGTGAGGTCAATAC
lpg0533_F	GATTGCTTGCGTTCTGACCAAACCTTGCAATATG
lpg0533_R	ATTATAAGCGACCTCACCACGAGGAACTGGTAAATC
lpg1974_F	TGCCGATGAACTTGAGGTGAATAAGGATTGGCTAC
lpg1974_R	TGCATCAGGCAGAACCAGCAGATTATTGCGTTTAC
lpg0688_F	CCCATATCGCTGTCATCGGTATTGTTTGCCCTAAG
lpg0688_R	TTCGCTCTGCAATTTGATCCACTGCTTCTG
lpg1369-F	GCCTTCAGTAGGGTAGCTTAATTTC
lpg1369-R	GGTATTAGTCGCGGTACGATCAG
lpg0507_F	GCTGATGCGGGTAATGTATTTGCTTCCGGGAC
lpg0507_R	GCTTCTGACGGATTGGAGACTACAACAC
lpg0773_F	CCACTCCAGCGATTTACCC
lpg0773_R	CTGCGCTGCTCTCTATCAG
lpg1187_F	CTTGATGCGCAATTACTCAGCG
lpg1187_R	GCATTAGGGCTTAACAAGGCAGCGGAG
lpg0695_F	GATGGGATGCTATTTCTGCATCGTTGGGAG
lpg0695_R	CGTCTGTCACTTGAAATGGTACAACCTG
lpg2510_F	CAATTCATTGCGGTAGGCATAACTC
lpg2510_R	CACTGAGTTGGTGTTCAGCAG
lpg2511_F	CACGGTTGTGTTGAGGCGTATGTG
lpg2511_R	GCAAACCTGGCAGGACAAGAGGAAGGC
lpg0450_F	GGTGTGCTCAATGGTAGGTATTCC
lpg0450_R	GCTGCAGCAATCGAACCGGTAGTAG
lpg0452_F	CGTTGGAAAGGCATGGAGTCAACAGG
lpg0452_R	GCGCACCCAATCAAATAAGCGCCTC
lpg0326-IF-pET22-F	AAGGAGATATACATATGGCAACTCCATTAAAACTATATAGAA
lpg0326-IF-pET22-R	GGTGGTGGTGCTCGAGTTGTTTCTTGATAATTGCTTCAGC
lpg0314-IF-pET22-F	AAGGAGATATACATATGGCGAAGGAAAAATTTGAACGT
lpg0314-IF-pET22-R	GGTGGTGGTGCTCGAGCTCGATTATTTTAGCGACTACACCG
lpg1841-IF-pET22-F	AAGGAGATATACATATGAAATTTACAAGTTTATTAACAGCTG
lpg1841-IF-pET22-R	GGTGGTGGTGCTCGAGATTGCCAGCCGCCTTTTTAATTAAC

lpg0533-IF-pET22-F	AAGGAGATATACATATGTCTATTGAAGTCAAAGTACCTGTTC
lpg0533-IF-pET22-R	GGTGGTGGTGCTCGAGAACATTCAGTAAAAGTCGGGATGG
lpg1974-IF-pET22-F	AAGGAGATATACATATGTTTAGTTTGAAAAAAACAACTGCGG
lpg1974-IF-pET22-R	GGTGGTGGTGCTCGAGGACATTGCCAACGTATTTTAAGCC
lpg0773-IF-pET22-F	AAGGAGATATACATATGAGTTGGTCTATTCGTATTG
lpg0773-IF-pET22-R	GGTGGTGGTGCTCGAGCTTTTCAGTGACTAATTCATGC
lpg1187-IF-pET22-F	AAGGAGATATACATATGATTATGTGGTTCAATAATG
lpg1187-IF-pET22-R	GGTGGTGGTGCTCGAGTATTGTGCAATCTTCTGCAAT
lpg0450-IF-pET22-F	AAGGAGATATACATATGATGAAGAAATATGATCAATTATG
lpg0450-IF-pET22-R	GGTGGTGGTGCTCGAGTAACCCTTCTACCTTGAGTTGC
lpg0452-IF-pET22-F	AAGGAGATATACATATGATGGCAGAGCACGATCAAAATAATG
lpg0452-IF-pET22-R	GGTGGTGGTGCTCGAGACTATCTTCTTGACTAAACTTAATC
pET22_lin_F	TCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATC
pET22_lin-R	TATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTC

D. Δεδομένα (A_{450}) από την ELISA με τις απομονωμένες πρωτεΐνες και τους ορούς ασθενών της *Legionella*, της *Coxiella* και των αιμοδοτών

Ορoί *Legionella*

patient code	IFA old	IFA new		Elongation Factor G	Elongation Factor T2	Dihydrolipoamide Succinyltransferase	27kDa Outer Membrane Protein
				1μg	1μg	2μg	0.01μg
37	960	480		0,2	0,277	0,334	0,243
231	3840	0		0,7	0,498	0,624	0,341
257	960	0		0,478	0,472	0,708	0,476
5	960	240		0,954	1,483	1,204	1,063
27	960	240		0,334	0,435	0,512	0,38
17	1920	960		0,458	0,556	0,65	0,331
450	30720	960		1,001	1,179	1,772	0,216
334	960	480		0,24	0,279	0,429	0,317
64	960	0		0,47	0,421	1,151	0,647
53	3840	0		0,284	0,251	0,471	0,309
103	960	240		0,416	0,44	0,458	0,727
96	7680	960		0,395	0,52	0,555	0,325
303	960	240		0,178	0,199	0,238	0,208
324	960			0,238	0,28	0,316	0,243
339	960	960		0,348	0,656	0,413	0,769
14	960			0,451	0,582	0,551	0,787
15	1920	480		0,325	0,286	0,451	0,315
514	960	960		0,424	0,365	0,551	
207	7680	480		0,399	0,416	0,506	0,38
1566	960	960		0,255	0,5	0,553	0,317
74	3840	0		0,359	0,377	0,41	0,461
321	512			0,361	1,345	0,475	0,701
367I				0,346	0,556	0,617	1,118
367II				0,336	0,41	0,549	0,587

Εικόνα 36 Αποτελέσματα (A_{450}) της ELISA με τις απομονωμένες πρωτεΐνες και τους ορούς της Legionella. Το πορτοκαλί χρώμα αντιπροσωπεύει τις τιμές A_{450} που ήταν μεγαλύτερες από την τιμή 1 και τα γκρι για τιμές κοντά στην τιμή 1. Πορτοκαλί για $A_{450} > 1$, γκρι για $A_{450} \sim 1$.

Ορoί *Coxiella*

Serum	Elongation Factor G	Elongation Factor T2	Dihydrolipoamide Succinyltransferase
	1μg	1μg	2μg
3125	0,367	0,431	0,631
3144	0,163	0,107	0,093
3164	0,505	0,684	0,958
3166	0,208	0,26	0,534
3170	0,167	0,24	0,249
3177	0,212	0,201	0,373
3195	0,357	0,487	0,96
3207	0,362	0,474	0,588
3214	0,564	0,802	0,903
3236	0,53	0,556	0,754
191	0,38	1,134	0,65

Εικόνα 37 Αποτελέσματα (A_{450}) της ELISA με τις απομονωμένες πρωτεΐνες και τους ορούς της Coxiella. Το πορτοκαλί χρώμα αντιπροσωπεύει τις τιμές A_{450} που ήταν μεγαλύτερες από την τιμή 1 και τα γκρι για τιμές κοντά στην τιμή 1. Πορτοκαλί για $A_{450} > 1$, γκρι για $A_{450} \sim 1$.

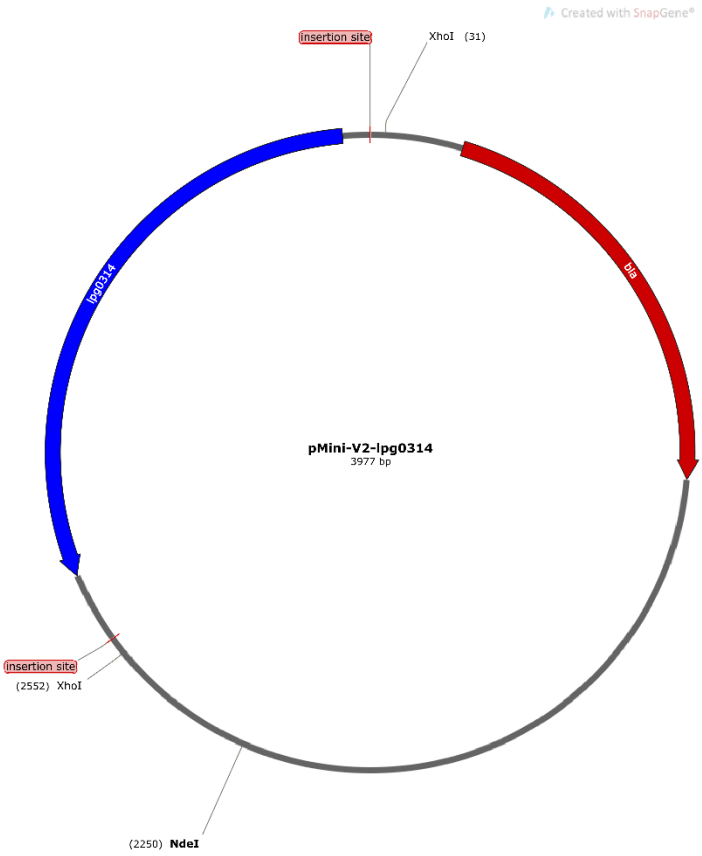
Ορoί αιμοδοτών

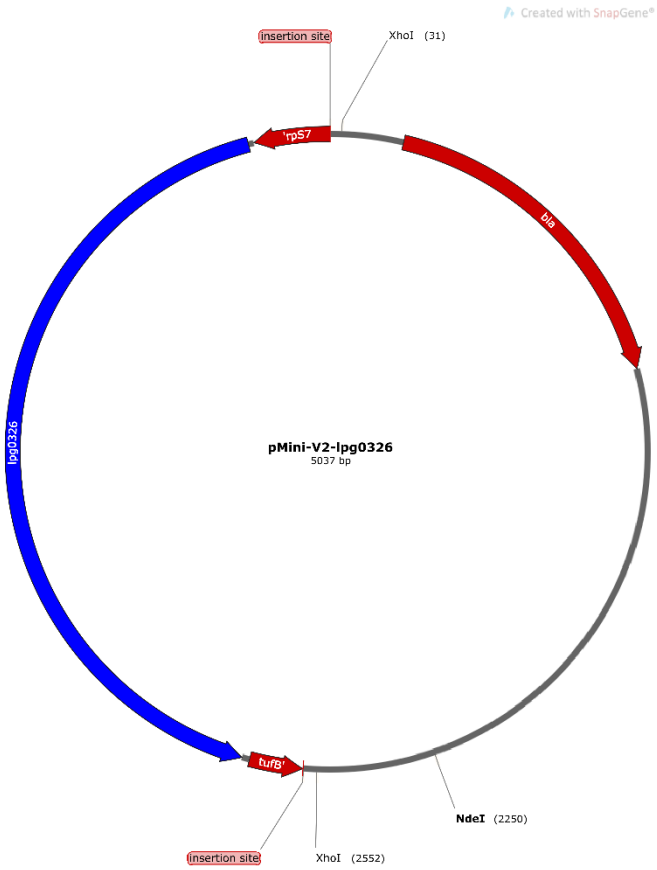
Serum	Elongation Factor G	Elongation Factor T2	Dihydrolipoamide Succinyltransferase
	1μg	1μg	2μg
1983	0,336	0,343	0,415
2808	0,223	0,236	0,316
2762	0,197	0,236	0,297
54653	0,168	0,177	0,203
2764	0,175	0,135	0,162
2	0,226	0,254	0,301
63691	0,199	0,191	0,253
2804	0,428	0,575	0,408
64501	0,26	0,346	0,399
2733	0,233	0,223	0,314

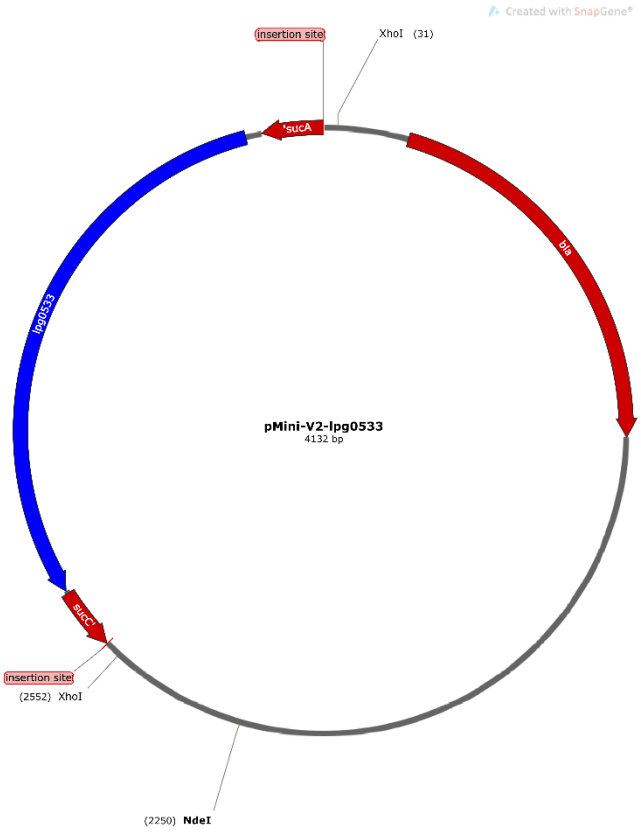
Εικόνα 38 Αποτελέσματα (A_{450}) της ELISA με τις απομονωμένες πρωτεΐνες και τους ορούς των αιμοδοτών.

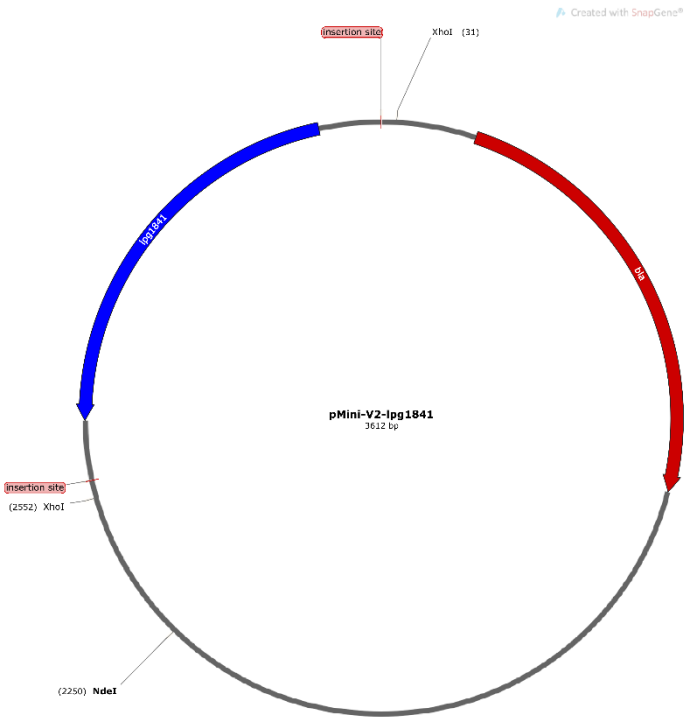
Ε. Πλασμίδια

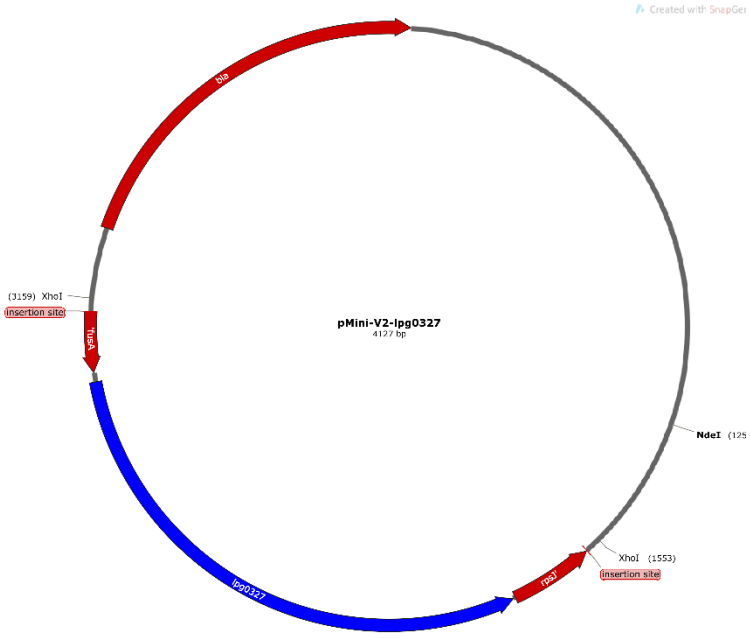
Πλασμίδια pMini

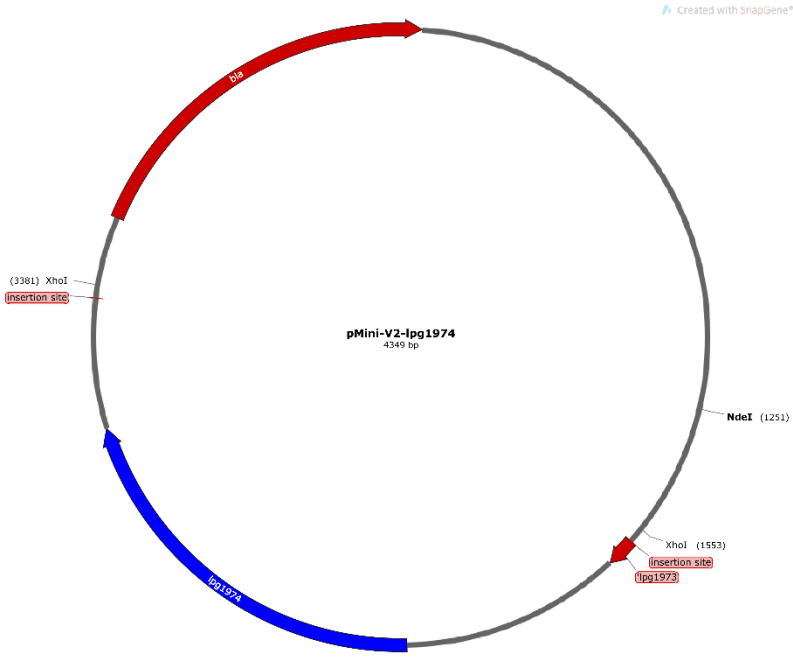




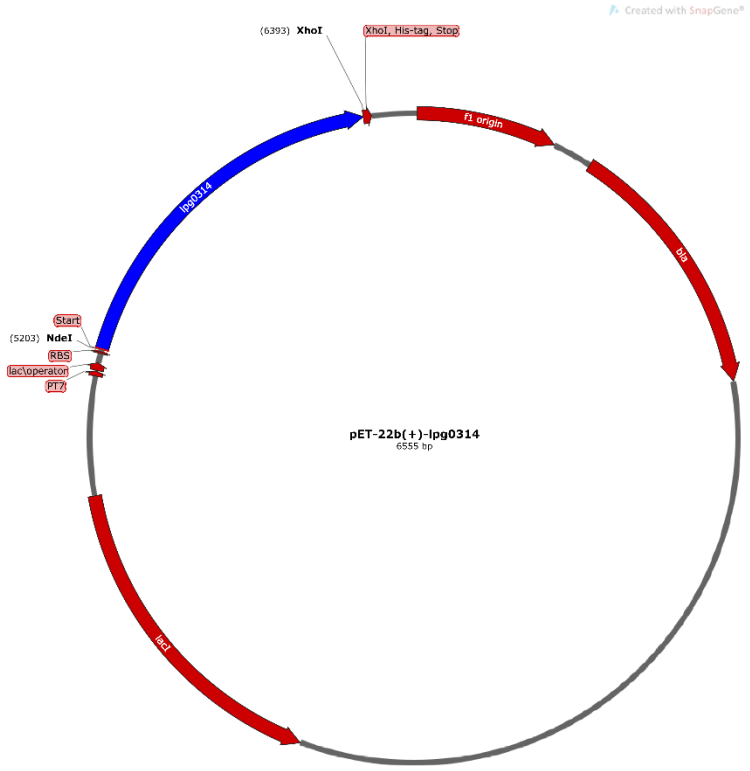


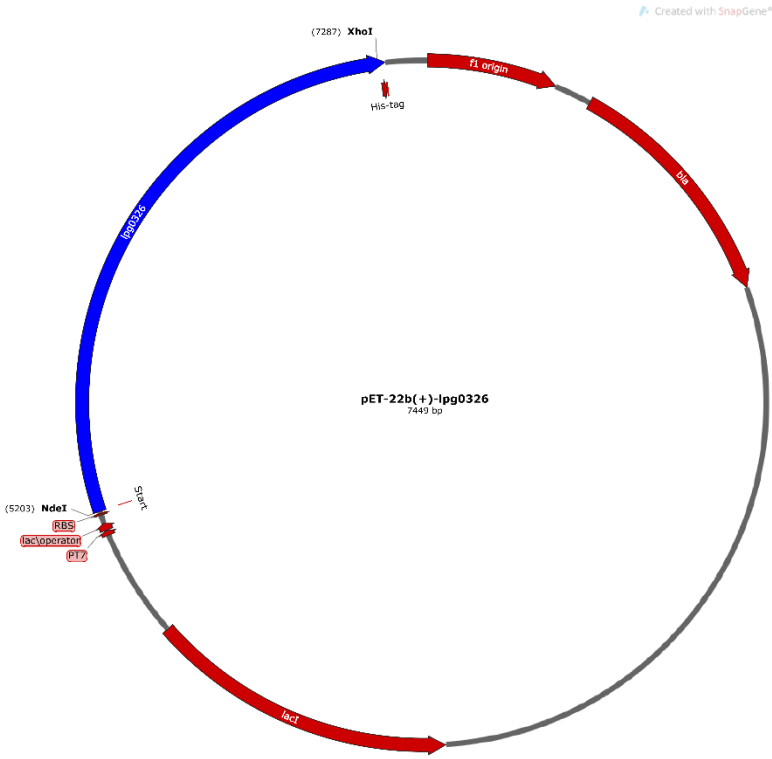


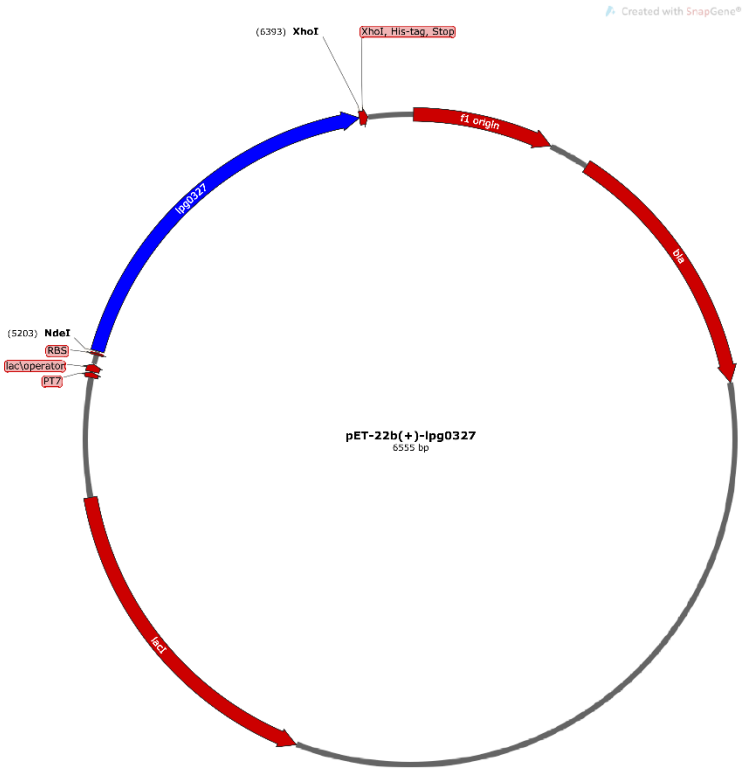


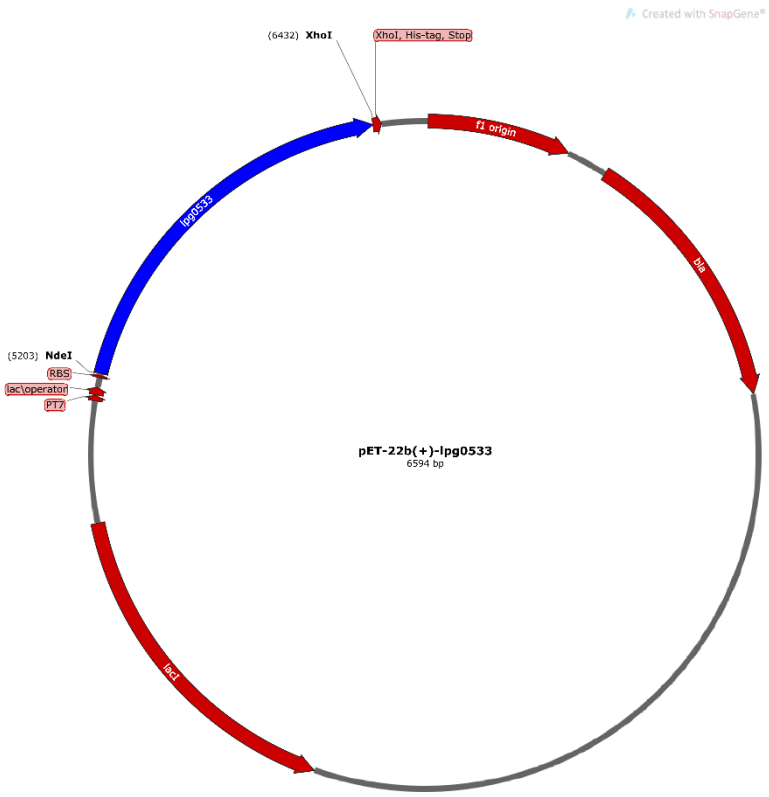


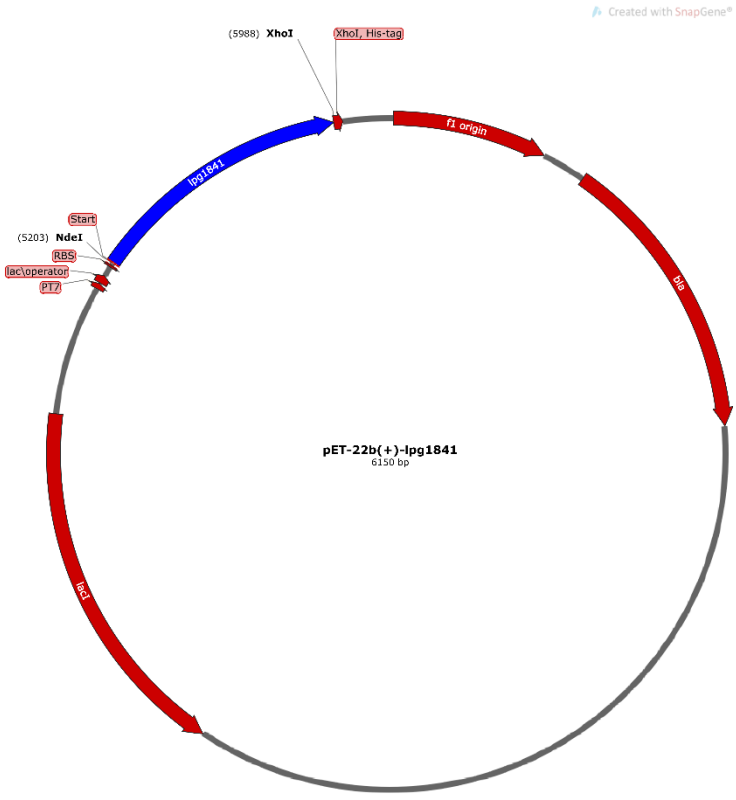
Πλασμίδια pET22b(+)

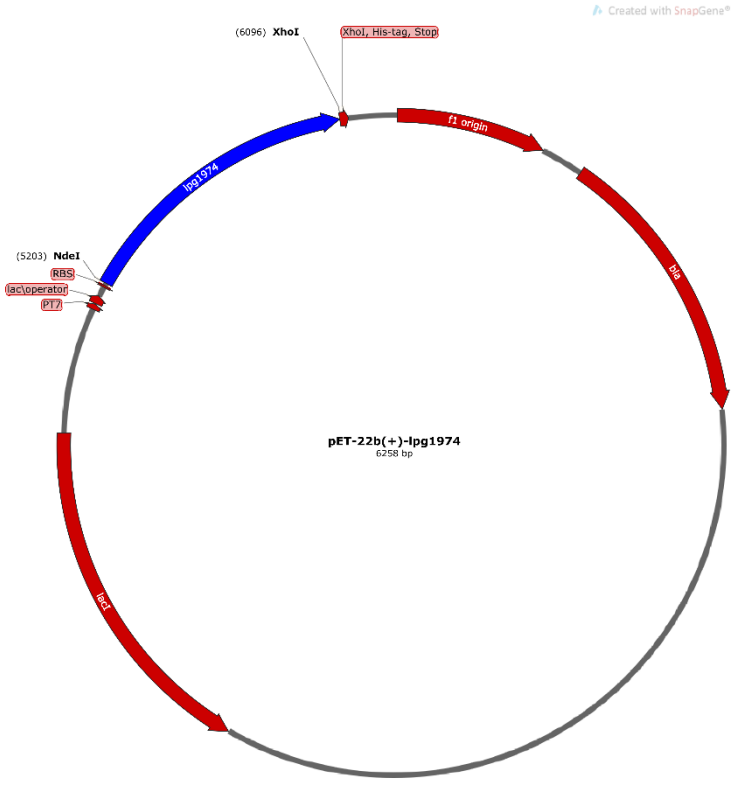





Created with SnapGene®
(6393) XhoI
XhoI, His-tag, Stop
f1 origin
lpg0327
bla
(5203) NdeI
RBS
lac\operator
PT7
lacI
pET-22b(+)-lpg0327
6555 bp


Created with SnapGene®
(6432) XhoI
XhoI, His-tag, Stop
f1 origin
lpg0533
bla
(5203) NdeI
RBS
lac\operator
PT7
lacI
pET-22b(+)-lpg0533
6594 bp


Created with SnapGene®
(5988) XhoI
XhoI, His-tag
f1 origin
lpg1841
bla
Start
(5203) NdeI
RBS
lac\operator
PT7
lacI
pET-22b(+)-lpg1841
6150 bp


Created with SnapGene®
(6096) XhoI
XhoI, His-tag, Stop
f1 origin
lpg1974
bla
(5203) NdeI
RBS
lac\operator
PT7
lacI
pET-22b(+)-lpg1974
6258 bp

F. Μείγμα ορών

Το μείγμα ορών αποτελούνταν από τους παρακάτω ορούς (1:500 αραίωση για τον καθένα):

- 367I
- 367II
- 17
- 450
- 27
- 96
- 339
- 14
- 207
- 303
- 321
- 334
- 1566
- 53
- 64
- 231
- 53883

G. Αλληλούχιση τελικών πλασμιδίων (με κόκκινο τα γονίδια ενδιαφέροντος)

pET22b(+)-lpg0326

```
           1                                                                                                   100
     pET1  TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           101                                                                                                 200
     pET1  CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           201                                                                                                 300
     pET1  GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           301                                                                                                 400
     pET1  CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACACTC AACCCTATCT CGGTCTATTC TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTC GGCCTATTGG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           401                                                                                                 500
     pET1  TTAAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAAT ATTAACGTTT ACAATTTCAG GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           501                                                                                                 600
     pET1  CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA GGAAGAGTAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           601                                                                                                 700
     pET1  GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           701                                                                                                 800
     pET1  GAAGATCAGT TGGGTGCACG AGTGGGTTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT TTCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           801                                                                                                 900
     pET1  GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTCG CCGCATACAC TATTCTCAGA ATGACTTGGT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           901                                                                                                1000
     pET1  TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TGCGGCCAAC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1001                                                                                               1100
     pET1  TTACTTCTGA CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA CTCGCCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1101                                                                                               1200
     pET1  ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC TGCAGCAATG GCAACAACGT TGCGCAAACT ATTAACTGGC GAACTACTTA CTCTAGCTTC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
```

```
          1201                                                                                                1300
     pET1 CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          1301                                                                                                1400
     pET1 GCCGGTGAGC GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          1401                                                                                                1500
     pET1 TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAAC TGTCAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT AGATTGATTT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          1501                                                                                                1600
     pET1 AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          1601                                                                                                1700
     pET1 GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          1701                                                                                                1800
     pET1 GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          1801                                                                                                1900
     pET1 CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          1901                                                                                                2000
     pET1 TTGGACTCAA GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGGTTCG TGCACACAGC CCAGCTTGGA GCGAACGACC TACACCGAAC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          2001                                                                                                2100
     pET1 TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          2101                                                                                                2200
     pET1 CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCCTG GTATCTTTAT AGTCCTGTCG GGTTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          2201                                                                                                2300
     pET1 GGGCGGAGCC TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG CTCACATGTT CTTTCCTGCG TTATCCCCTG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          2301                                                                                                2400
     pET1 ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG AGTGAGCTGA TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCA GTGAGCGAGG AAGCGGAAGA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          2401                                                                                                2500
     pET1 GCGCCTGATG CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTCACACC GCATATATGG TGCACTCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCC GCATAGTTAA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          2501                                                                                                2600
     pET1 GCCAGTATAC ACTCCGCTAT CGCTACGTGA CTGGGTCATG GCTGCGCCCC GACACCCGCC AACACCCGCT GACGCGCCCT GACGGGCTTG TCTGCTCCCG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          2601                                                                                                2700
     pET1 GCATCCGCTT ACAGACAAGC TGTGACCGTC TCCGGGAGCT GCATGTGTCA GAGGTTTTCA CCGTCATCAC CGAAACGCGC GAGGCAGCTG CGGTAAAGCT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          2701                                                                                                2800
     pET1 CATCAGCGTG GTCGTGAAGC GATTCACAGA TGTCTGCCTG TTCATCCGCG TCCAGCTCGT TGAGTTTCTC CAGAAGCGTT AATGTCTGGC TTCTGATAAA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          2801                                                                                                2900
     pET1 GCGGGCCATG TTAAGGGCGG TTTTTTCCTG TTTGGTCACT GATGCCTCCG TGTAAGGGGG ATTTCTGTTC ATGGGGGTAA TGATACCGAT GAAACGAGAG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
```

```
          2901                                                                                                3000
     pET1 AGGATGCTCA CGATACGGGT TACTGATGAT GAACATGCCC GGTTACTGGA ACGTTGTGAG GGTAAACAAC TGGCGGTATG GATGCGGCGG GACCAGAGAA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          3001                                                                                                3100
     pET1 AAATCACTCA GGGTCAATGC CAGCGCTTCG TTAATACAGA TGTAGGTGTT CCACAGGGTA GCCAGCAGCA TCCTGCGATG CAGATCCGGA ACATAATGGT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          3101                                                                                                3200
     pET1 GCAGGGCGCT GACTTCCGCG TTTCCAGACT TTACGAAACA CGGAAACCGA AGACCATTCA TGTTGTTGCT CAGGTCGCAG ACGTTTTGCA GCAGCAGTCG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          3201                                                                                                3300
     pET1 CTTCACGTTC GCTCGCGTAT CGGTGATTCA TTCTGCTAAC CAGTAAGGCA ACCCCGCCAG CCTAGCCGGG TCCTCAACGA CAGGAGCACG ATCATGCGCA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          3301                                                                                                3400
     pET1 CCCGTGGGGC CGCCATGCCG GCGATAATGG CCTGCTTCTC GCCGAAACGT TTGGTGGCGG GACCAGTGAC GAAGGCTTGA GCGAGGGCGT GCAAGATTCC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          3401                                                                                                3500
     pET1 GAATACCGCA AGCGACAGGC CGATCATCGT CGCGCTCCAG CGAAAGCGGT CCTCGCCGAA AATGACCCAG AGCGCTGCCG GCACCTGTCC TACGAGTTGC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          3501                                                                                                3600
     pET1 ATGATAAAGA AGACAGTCAT AAGTGCGGCG ACGATAGTCA TGCCCCGCGC CCACCGGAAG GAGCTGACTG GGTTGAAGGC TCTCAAGGGC ATCGGTCGAG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          3601                                                                                                3700
     pET1 ATCCCGGTGC CTAATGAGTG AGCTAACTTA CATTAATTGC GTTGCGCTCA CTGCCCGCTT TCCAGTCGGG AAACCTGTCG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          3701                                                                                                3800
     pET1 CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG TATTGGGCGC CAGGGTGGTT TTTCTTTTCA CCAGTGAGAC GGGCAACAGC TGATTGCCCT TCACCGCCTG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          3801                                                                                                3900
     pET1 GCCCTGAGAG AGTTGCAGCA AGCGGTCCAC GCTGGTTTGC CCCAGCAGGC GAAAATCCTG TTTGATGGTG GTTAACGGCG GGATATAACA TGAGCTGTCT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          3901                                                                                                4000
     pET1 TCGGTATCGT CGTATCCCAC TACCGAGATA TCCGCACCAA CGCGCAGCCC GGACTCGGTA ATGGCGCGCA TTGCGCCCAG CGCCATCTGA TCGTTGGCAA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          4001                                                                                                4100
     pET1 CCAGCATCGC AGTGGGAACG ATGCCCTCAT TCAGCATTTG CATGGTTTGT TGAAAACCGG ACATGGCACT CCAGTCGCCT TCCCGTTCCG CTATCGGCTG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          4101                                                                                                4200
     pET1 AATTTGATTG CGAGTGAGAT ATTTATGCCA GCCAGCCAGA CGCAGACGCG CCGAGACAGA ACTTAATGGG CCCGCTAACA GCGCGATTTG CTGGTGACCC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          4201                                                                                                4300
     pET1 AATGCGACCA GATGCTCCAC GCCCAGTCGC GTACCGTCTT CATGGGAGAA AATAATACTG TTGATGGGTG TCTGGTCAGA GACATCAAGA AATAACGCCG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          4301                                                                                                4400
     pET1 GAACATTAGT GCAGGCAGCT TCCACAGCAA TGGCATCCTG GTCATCCAGC GGATAGTTAA TGATCAGCCC ACTGACGCGT TGCGCGAGAA GATTGTGCAC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          4401                                                                                                4500
     pET1 CGCCGCTTTA CAGGCTTCGA CGCCGCTTCG TTCTACCATC GACACCACCA CGCTGGCACC CAGTTGATCG GCGCGAGATT TAATCGCCGC GACAATTTGC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          4501                                                                                                4600
     pET1 GACGGCGCGT GCAGGGCCAG ACTGGAGGTG GCAACGCCAA TCAGCAACGA CTGTTTGCCC GCCAGTTGTT GTGCCACGCG GTTGGGAATG TAATTCAGCT
      Seq
```

```
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4601                                                                                                 4700
     pET1  CCGCCATCGC CGCTTCCACT TTTTCCCGCG TTTTCGCAGA AACGTGGCTG GCCTGGTTCA CCACGCGGGA AACGGTCTGA TAAGAGACAC CGGCATACTC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4701                                                                                                 4800
     pET1  TGCGACATCG TATAACGTTA CTGGTTTCAC ATTCACCACC CTGAATTGAC TCTCTTCCGG GCGCTATCAT GCCATACCGC GAAAGGTTTT GCGCCATTCG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4801                                                                                                 4900
     pET1  ATGGTGTCCG GGATCTCGAC GCTCTCCCTT ATGCGACTCC TGCATTAGGA AGCAGCCCAG TAGTAGGTTG AGGCCGTTGA GCACCGCCGC CGCAAGGAAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4901                                                                                                 5000
     pET1  GGTGCATGCA AGGAGATGGC GCCCAACAGT CCCCCGGCCA CGGGGCCTGC CACCATACCC ACGCCGAAAC AAGCGCTCAT GAGCCCGAAG TGGCGAGCCC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5001                                                                                                 5100
     pET1  GATCTTCCCC ATCGGTGATG TCGGCGATAT AGGCGCCAGC AACCGCACCT GTGGCGCCGG TGATGCCGGC CACGATGCGT CCGGCGTAGA GGATCGAGAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5101                                                                                                 5200
     pET1  CTCGATCCCG CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTCC CCTCTAGAAA TAATTTTGTT TAACTTTAAG AAGGAGATAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5201                                                                                                 5300
     pET1  ACATATGGCA ACTCCATTAA AACTATATAG AAACATAGGC ATTGCAGCCC ACGTTGATGC TGGAAAAACA ACAACTACAG AACGAGTATT GTACTATACC
      Seq      ATGGCA ACTCCATTAA AACTATATAG AAACATAGGC ATTGCAGCCC ACGTTGATGC TGGAAAAACA ACAACTACAG AACGAGTATT GTACTATACC
Consensus  ....ATGGCA ACTCCATTAA AACTATATAG AAACATAGGC ATTGCAGCCC ACGTTGATGC TGGAAAAACA ACAACTACAG AACGAGTATT GTACTATACC

           5301                                                                                                 5400
     pET1  GGAATGTCTC ATAAGATTGG TGAAGTACAT GATGGCGCTG CAACTATGGA CTGGATGGTC CAGGAGCAGG AGCGTGGTAT TACCATTACT TCTGCTGCAA
      Seq  GGAATGTCTC ATAAGATTGG TGAAGTACAT GATGGCGCTG CAACTATGGA CTGGATGGTC CAGGAGCAGG AGCGTGGTAT TACCATTACT TCTGCTGCAA
Consensus  GGAATGTCTC ATAAGATTGG TGAAGTACAT GATGGCGCTG CAACTATGGA CTGGATGGTC CAGGAGCAGG AGCGTGGTAT TACCATTACT TCTGCTGCAA

           5401                                                                                                 5500
     pET1  CAACATGTTA TTGGTCTGGT ATGGACAAAC AATTTGAATC CCATCGGATC AATATAATTG ATACACCAGG ACACGTAGAC TTTATGATTG AAGTCGAACG
      Seq  CAACATGTTA TTGGTCTGGT ATGGACAAAC AATTTGAATC CCATCGGATC AATATAATTG ATACACCAGG ACACGTAGAC TTTATGATTG AAGTCGAACG
Consensus  CAACATGTTA TTGGTCTGGT ATGGACAAAC AATTTGAATC CCATCGGATC AATATAATTG ATACACCAGG ACACGTAGAC TTTATGATTG AAGTCGAACG

           5501                                                                                                 5600
     pET1  CTCTTTACGT GTACTAGATG GAGCAGTTGT TGTATTTGAT TCAGTTGCCG GCGTTGAACC TCAATCTGAA ACAGTATGGC GTCAAGCCAA TAAGTATGGT
      Seq  CTCTTTACGT GTACTAGATG GAGCAGTTGT TGTATTTGAT TCAGTTGCCG GCGTTGAACC TCAATCTGAA ACAGTATGGC GTCAAGCCAA TAAGTATGGT
Consensus  CTCTTTACGT GTACTAGATG GAGCAGTTGT TGTATTTGAT TCAGTTGCCG GCGTTGAACC TCAATCTGAA ACAGTATGGC GTCAAGCCAA TAAGTATGGT

           5601                                                                                                 5700
     pET1  GTTCCTCGTA TCGTTTTTGT AAATAAAATG GATAGGATGG GTGCCAATTT CCTAAGAGTT GTTAGCCAGA TTAAGCAAAG ATTGGGCTCT ACTCCTGTTG
      Seq  GTTCCTCGTA TCGTTTTTGT AAATAAAATG GATAGGATGG GTGCCAATTT CCTAAGAGTT GTTAGCCAGA TTAAGCAAAG ATTGGGCTCT ACTCCTGTTG
Consensus  GTTCCTCGTA TCGTTTTTGT AAATAAAATG GATAGGATGG GTGCCAATTT CCTAAGAGTT GTTAGCCAGA TTAAGCAAAG ATTGGGCTCT ACTCCTGTTG

           5701                                                                                                 5800
     pET1  TGTTGCAATT ACCAATTGGC GCAGAAGAAG AGTTCAAAGG TGTGATTGAT CTCATTAAAA TGAAGGCAAT TCACTGGGAT GAAGAAAATA AAGGTATGAC
      Seq  TGTTG
Consensus  TGTTG..... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5801                                                                                                 5900
     pET1  ATTTAAATAT GTTGATATCC CTGCTGATTT AAAGTCAACC TGTGAAGAAT ACCGTGCACA CATCATTGAA GCAGCAGCAG AATACTCTGA AGAGTTAATG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5901                                                                                                 6000
     pET1  GAAAAATATT TGGAAGGCGA AGAATTCACA GAGGCGGAAA TTAAAAAGGC TCTTCGTCAT CTGACAATCA CAAATAAAGT TGTTCCTGTA TTCTGTGGAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           6001                                                                                                 6100
     pET1  CAGCCTTTAA GAATAAGGGT GTCCAAGCAG TACTCGATGG AGTAATAGAA TATTTACCAT CACCCACTGA CATTCCTGAT ATTCAGGGAG TTGATGAGCA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           6101                                                                                                 6200
     pET1  TGGTGATGTA ATCCATAGAA AAACCAGTTA TGATGAACCA TTCTCAGCGT TAGCGTTCAA AATTGCAACT GACCCATTTG TGGGTACGCT AACATATTTT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           6201                                                                                                 6300
     pET1  AGAGCTTATT CTGGTATTCT TAAGAGTGGG GATACTGTCT ACAACTCAGT TAAGGGTAAA AAAGAACGTA TTGGCCGTTT GTTGCAGATG CACGCCAATT
```

```
      Seq
Consensus  ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....

           6301                                                       6400
     pET1  CACGTGAAGA AATTAAAGAA GTGCGAGCAG GGGACATAGC TGCTGCTGTT GGACTTAAAA CAGTAACTAC TGGTGACACC CTCTGTGATC AAGATAAAGT
      Seq
Consensus  ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....

           6401                                                       6500
     pET1  TGTAATATTA GAGAGAATGG ATTTCCCAGA TCCAGTTATT GCAGTTGCTG TTGAACCAAA AACTAAAGCG GATCAGGAAA AAATGGGAAT TGCTTTAGGC
      Seq
Consensus  ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....

           6501                                                       6600
     pET1  AAGTTAGCCC AGGAAGACCC TTCTTTCAGA GTACATACTG ATGAAGAGTC AGGCCAGACA ATCATTCAAG GTATGGGTGA ATTACACCTT GAAATTATTG
      Seq
Consensus  ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....

           6601                                                       6700
     pET1  TTGACCGCAT GAAGAGAGAG TTCAATGTAG AAGCTAATGT TGGTAAACCT CAGGTTGCAT ACCGAGAGAC ACTCAAGCAA GCTGTTGAAC AAGAGGGTAA
      Seq
Consensus  ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....

           6701                                                       6800
     pET1  GTTCGTAAGG CAATCAGGTG GACGTGGTCA ATATGGACAT GTATGGTTGA AAATTGAACC ACAAGAACCA GGAAAAGGTT ATGAATTTAT CAATGCTATC
      Seq
Consensus  ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....

           6801                                                       6900
     pET1  GTTGGTGGCG TGATTCCCAA AGAATATATC CCTGCAGTAG ATAAAGGGAT TCAAGAGCAA ATGCAAAATG GTGTAATTGC TGGATATCCA GTGGTTGATG
      Seq             GATTCCCAA AGAATATATC CCTGCAGTAG ATAAAGGGAT TCAAGAGCAA ATGCAAAATG GTGTAATTGC TGGATATCCA GTGGTTGATG
Consensus  ..... .GATTCCCAA AGAATATATC CCTGCAGTAG ATAAAGGGAT TCAAGAGCAA ATGCAAAATG GTGTAATTGC TGGATATCCA GTGGTTGATG

           6901                                                       7000
     pET1  TTAAAGTTAC ACTGTTTGAT GGTTCATTCC ATGAAGTTGA TTCAAGCGAA ATGGCATTTA AAATTGCTGG GTCTCAATGC TTCAAGCAAG GTGCATTAAA
      Seq  TTAAAGTTAC ACTGTTTGAT GGTTCATTCC ATGAAGTTGA TTCAAGCGAA ATGGCATTTA AAATTGCTGG GTCTCAATGC TTCAAGCAAG GTGCATTAAA
Consensus  TTAAAGTTAC ACTGTTTGAT GGTTCATTCC ATGAAGTTGA TTCAAGCGAA ATGGCATTTA AAATTGCTGG GTCTCAATGC TTCAAGCAAG GTGCATTAAA

           7001                                                       7100
     pET1  GGCGAAACCG GTACTTCTTG AGCCAATTAT GAGTGTCGAA GTTGTTACAC CCGAAGATTA CATGGGCGAT GTTATGGGTG ATCTGAACAG ACGCCGTGGT
      Seq  GGCGAAACCG GTACTTCTTG AGCCAATTAT GAGTGTCGAA GTTGTTACAC CCGAAGATTA CATGGGCGAT GTTATGGGTG ATCTGAACAG ACGCCGTGGT
Consensus  GGCGAAACCG GTACTTCTTG AGCCAATTAT GAGTGTCGAA GTTGTTACAC CCGAAGATTA CATGGGCGAT GTTATGGGTG ATCTGAACAG ACGCCGTGGT

           7101                                                       7200
     pET1  TTAGTTCAAG GTATGGAAGA CTCACCAGCA GGCAAAATAG TTAGAGCAGA GGTGCCGCTT GCAGAGATGT TTGGTTATTC AACTGACTTA CGTTCTGCTA
      Seq  TTAGTTCAAG GTATGGAAGA CTCACCAGCA GGCAAAATAG TTAGAGCAGA GGTGCCGCTT GCAGAGATGT TTGGTTATTC AACTGACTTA CGTTCTGCTA
Consensus  TTAGTTCAAG GTATGGAAGA CTCACCAGCA GGCAAAATAG TTAGAGCAGA GGTGCCGCTT GCAGAGATGT TTGGTTATTC AACTGACTTA CGTTCTGCTA

           7201                                                       7300
     pET1  CACAAGGAAG AGCAACCTAC ACTATGGAGT TTTGTAAGTA CGCAGAAGCG CCAACAAATA TTGCTGAAGC AATTATCAAG AAACAACTCG AGCACCACCA
      Seq  CACAAGGAAG AGCAACCTAC ACTATGGAGT TTTGTAAGTA CGCAGAAGCG CCAACAAATA TTGCTGAAGC AATTATCAAG AAACAACTCG AGCACCACCA
Consensus  CACAAGGAAG AGCAACCTAC ACTATGGAGT TTTGTAAGTA CGCAGAAGCG CCAACAAATA TTGCTGAAGC AATTATCAAG AAACAACTCG AGCACCACCA

           7301                                                       7400
     pET1  CCACCACCAC TGAGATCCGG CTGCTAACAA AGCCCGAAAG GAAGCTGAGT TGGCTGCTGC CACCGCTGAG CAATAACTAG CATAACCCCT TGGGGCCTCT
      Seq  CCACCACCAC TGA
Consensus  CCACCACCAC TGA..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....

           7401                                          7449
     pET1  AAACGGGTCT TGAGGGGTTT TTTGCTGAAA GGAGGAACTA TATCCGGAT
      Seq
Consensus  ..... ..... ..... ..... .....
```

pET22b(+)-lpg0314

```
          1                                                                                                   100
    pET3  TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          101                                                                                                 200
    pET3  CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          201                                                                                                 300
    pET3  GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          301                                                                                                 400
    pET3  CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACACTC AACCCTATCT CGGTCTATTC TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTC GGCCTATTGG
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          401                                                                                                 500
    pET3  TTAAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAAT ATTAACGTTT ACAATTTCAG GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          501                                                                                                 600
    pET3  CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA GGAAGAGTAT
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          601                                                                                                 700
    pET3  GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          701                                                                                                 800
    pET3  GAAGATCAGT TGGGTGCACG AGTGGGTTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT TTCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          801                                                                                                 900
    pET3  GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTCG CCGCATACAC TATTCTCAGA ATGACTTGGT
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          901                                                                                                1000
    pET3  TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TGCGGCCAAC
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          1001                                                                                               1100
    pET3  TTACTTCTGA CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA CTCGCCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          1101                                                                                               1200
    pET3  ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC TGCAGCAATG GCAACAACGT TGCGCAAACT ATTAACTGGC GAACTACTTA CTCTAGCTTC
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
```

```
          1201                                                                                                1300
     pET3 CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1301                                                                                                1400
     pET3 GCCGGTGAGC GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1401                                                                                                1500
     pET3 TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAAC TGTCAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT AGATTGATTT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1501                                                                                                1600
     pET3 AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1601                                                                                                1700
     pET3 GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1701                                                                                                1800
     pET3 GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1801                                                                                                1900
     pET3 CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1901                                                                                                2000
     pET3 TTGGACTCAA GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGGTTCG TGCACACAGC CCAGCTTGGA GCGAACGACC TACACCGAAC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2001                                                                                                2100
     pET3 TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2101                                                                                                2200
     pET3 CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCCTG GTATCTTTAT AGTCCTGTCG GGTTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2201                                                                                                2300
     pET3 GGGCGGAGCC TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG CTCACATGTT CTTTCCTGCG TTATCCCCTG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2301                                                                                                2400
     pET3 ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG AGTGAGCTGA TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCA GTGAGCGAGG AAGCGGAAGA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2401                                                                                                2500
     pET3 GCGCCTGATG CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTCACACC GCATATATGG TGCACTCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCC GCATAGTTAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2501                                                                                                2600
     pET3 GCCAGTATAC ACTCCGCTAT CGCTACGTGA CTGGGTCATG GCTGCGCCCC GACACCCGCC AACACCCGCT GACGCGCCCT GACGGGCTTG TCTGCTCCCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2601                                                                                                2700
     pET3 GCATCCGCTT ACAGACAAGC TGTGACCGTC TCCGGGAGCT GCATGTGTCA GAGGTTTTCA CCGTCATCAC CGAAACGCGC GAGGCAGCTG CGGTAAAGCT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2701                                                                                                2800
     pET3 CATCAGCGTG GTCGTGAAGC GATTCACAGA TGTCTGCCTG TTCATCCGCG TCCAGCTCGT TGAGTTTCTC CAGAAGCGTT AATGTCTGGC TTCTGATAAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2801                                                                                                2900
     pET3 GCGGGCCATG TTAAGGGCGG TTTTTTCCTG TTTGGTCACT GATGCCTCCG TGTAAGGGGG ATTTCTGTTC ATGGGGGTAA TGATACCGAT GAAACGAGAG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........
```

```
          2901                                                                                                3000
     pET3 AGGATGCTCA CGATACGGGT TACTGATGAT GAACATGCCC GGTTACTGGA ACGTTGTGAG GGTAAACAAC TGGCGGTATG GATGCGGCGG GACCAGAGAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3001                                                                                                3100
     pET3 AAATCACTCA GGGTCAATGC CAGCGCTTCG TTAATACAGA TGTAGGTGTT CCACAGGGTA GCCAGCAGCA TCCTGCGATG CAGATCCGGA ACATAATGGT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3101                                                                                                3200
     pET3 GCAGGGCGCT GACTTCCGCG TTTCCAGACT TTACGAAACA CGGAAACCGA AGACCATTCA TGTTGTTGCT CAGGTCGCAG ACGTTTTGCA GCAGCAGTCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3201                                                                                                3300
     pET3 CTTCACGTTC GCTCGCGTAT CGGTGATTCA TTCTGCTAAC CAGTAAGGCA ACCCCGCCAG CCTAGCCGGG TCCTCAACGA CAGGAGCACG ATCATGCGCA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3301                                                                                                3400
     pET3 CCCGTGGGGC CGCCATGCCG GCGATAATGG CCTGCTTCTC GCCGAAACGT TTGGTGGCGG GACCAGTGAC GAAGGCTTGA GCGAGGGCGT GCAAGATTCC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3401                                                                                                3500
     pET3 GAATACCGCA AGCGACAGGC CGATCATCGT CGCGCTCCAG CGAAAGCGGT CCTCGCCGAA AATGACCCAG AGCGCTGCCG GCACCTGTCC TACGAGTTGC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3501                                                                                                3600
     pET3 ATGATAAAGA AGACAGTCAT AAGTGCGGCG ACGATAGTCA TGCCCCGCGC CCACCGGAAG GAGCTGACTG GGTTGAAGGC TCTCAAGGGC ATCGGTCGAG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3601                                                                                                3700
     pET3 ATCCCGGTGC CTAATGAGTG AGCTAACTTA CATTAATTGC GTTGCGCTCA CTGCCCGCTT TCCAGTCGGG AAACCTGTCG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3701                                                                                                3800
     pET3 CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG TATTGGGCGC CAGGGTGGTT TTTCTTTTCA CCAGTGAGAC GGGCAACAGC TGATTGCCCT TCACCGCCTG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3801                                                                                                3900
     pET3 GCCCTGAGAG AGTTGCAGCA AGCGGTCCAC GCTGGTTTGC CCCAGCAGGC GAAAATCCTG TTTGATGGTG GTTAACGGCG GGATATAACA TGAGCTGTCT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3901                                                                                                4000
     pET3 TCGGTATCGT CGTATCCCAC TACCGAGATA TCCGCACCAA CGCGCAGCCC GGACTCGGTA ATGGCGCGCA TTGCGCCCAG CGCCATCTGA TCGTTGGCAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4001                                                                                                4100
     pET3 CCAGCATCGC AGTGGGAACG ATGCCCTCAT TCAGCATTTG CATGGTTTGT TGAAAACCGG ACATGGCACT CCAGTCGCCT TCCCGTTCCG CTATCGGCTG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4101                                                                                                4200
     pET3 AATTTGATTG CGAGTGAGAT ATTTATGCCA GCCAGCCAGA CGCAGACGCG CCGAGACAGA ACTTAATGGG CCCGCTAACA GCGCGATTTG CTGGTGACCC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4201                                                                                                4300
     pET3 AATGCGACCA GATGCTCCAC GCCCAGTCGC GTACCGTCTT CATGGGAGAA AATAATACTG TTGATGGGTG TCTGGTCAGA GACATCAAGA AATAACGCCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4301                                                                                                4400
     pET3 GAACATTAGT GCAGGCAGCT TCCACAGCAA TGGCATCCTG GTCATCCAGC GGATAGTTAA TGATCAGCCC ACTGACGCGT TGCGCGAGAA GATTGTGCAC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4401                                                                                                4500
     pET3 CGCCGCTTTA CAGGCTTCGA CGCCGCTTCG TTCTACCATC GACACCACCA CGCTGGCACC CAGTTGATCG GCGCGAGATT TAATCGCCGC GACAATTTGC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4501                                                                                                4600
     pET3 GACGGCGCGT GCAGGGCCAG ACTGGAGGTG GCAACGCCAA TCAGCAACGA CTGTTTGCCC GCCAGTTGTT GTGCCACGCG GTTGGGAATG TAATTCAGCT
      Seq
```

```
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4601                                                                                                 4700
     pET3  CCGCCATCGC CGCTTCCACT TTTTCCCGCG TTTTCGCAGA AACGTGGCTG GCCTGGTTCA CCACGCGGGA AACGGTCTGA TAAGAGACAC CGGCATACTC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4701                                                                                                 4800
     pET3  TGCGACATCG TATAACGTTA CTGGTTTCAC ATTCACCACC CTGAATTGAC TCTCTTCCGG GCGCTATCAT GCCATACCGC GAAAGGTTTT GCGCCATTCG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4801                                                                                                 4900
     pET3  ATGGTGTCCG GGATCTCGAC GCTCTCCCTT ATGCGACTCC TGCATTAGGA AGCAGCCCAG TAGTAGGTTG AGGCCGTTGA GCACCGCCGC CGCAAGGAAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4901                                                                                                 5000
     pET3  GGTGCATGCA AGGAGATGGC GCCCAACAGT CCCCCGGCCA CGGGGCCTGC CACCATACCC ACGCCGAAAC AAGCGCTCAT GAGCCCGAAG TGGCGAGCCC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5001                                                                                                 5100
     pET3  GATCTTCCCC ATCGGTGATG TCGGCGATAT AGGCGCCAGC AACCGCACCT GTGGCGCCGG TGATGCCGGC CACGATGCGT CCGGCGTAGA GGATCGAGAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5101                                                                                                 5200
     pET3  CTCGATCCCG CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTCC CCTCTAGAAA TAATTTTGTT TAACTTTAAG AAGGAGATAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5201                                                                                                 5300
     pET3  ACATATGGCG AAGGAAAAAT TTGAACGTAA GAAGCCGCAC GTAAACGTGG GCACGATTGG TCACGTAGAC CATGGCAAGA CGACATTGAC AGCAGCTATT
      Seq         GCG AAGGAAAAAT TTGAACGTAA GAAGCCGCAC GTAAACGTGG GCACGATTGG TCACGTAGAC CATGGCAAGA CGACATTGAC AGCAGCTATT
Consensus  .......GCG AAGGAAAAAT TTGAACGTAA GAAGCCGCAC GTAAACGTGG GCACGATTGG TCACGTAGAC CATGGCAAGA CGACATTGAC AGCAGCTATT

           5301                                                                                                 5400
     pET3  ACAACGATTA TGGCGAAGAA ATATGGTGGT ACAGCGAAGG CGTACGATCA AATTGATGCT GCGCCAGAAG AAAGAGAGCG TGGTATTACT ATTTCTACAG
      Seq  ACAACGATTA TGGCGAAGAA ATATGGTGGT ACAGCGAAGG CGTACGATCA AATTGATGCT GCGCCAGAAG AAAGAGAGCG TGGTATTACT ATTTCTACAG
Consensus  ACAACGATTA TGGCGAAGAA ATATGGTGGT ACAGCGAAGG CGTACGATCA AATTGATGCT GCGCCAGAAG AAAGAGAGCG TGGTATTACT ATTTCTACAG

           5401                                                                                                 5500
     pET3  CACACGTTGA GTACGAATCA GCGAGCAGAC ATTATGCGCA CGTAGACTGC CCGGGGCATG CTGACTATGT TAAGAACATG ATTACTGGTG CTGCGCAAAT
      Seq  CACACGTTGA GTACGAATCA GCGAGCAGAC ATTATGCGCA CGTAGACTGC CCGGGGCATG CTGACTATGT TAAGAACATG ATTACTGGTG CTGCGCAAAT
Consensus  CACACGTTGA GTACGAATCA GCGAGCAGAC ATTATGCGCA CGTAGACTGC CCGGGGCATG CTGACTATGT TAAGAACATG ATTACTGGTG CTGCGCAAAT

           5501                                                                                                 5600
     pET3  GGACGGAGCG ATACTGGTTG TATCAGCAGC TGATGGTCCT ATGCCACAAA CGAGGGAACA CATTCTATTG TCTCGCCAGG TAGGTGTTCC ATATATTGTT
      Seq  GGACGGAGCG ATACTGGTTG TATCAGCAGC TGATGGTCCT ATGCCACAAA CGAGGGAACA CATTCTATTG TCTCGCCAGG TAGGTGTTCC ATATATTGTT
Consensus  GGACGGAGCG ATACTGGTTG TATCAGCAGC TGATGGTCCT ATGCCACAAA CGAGGGAACA CATTCTATTG TCTCGCCAGG TAGGTGTTCC ATATATTGTT

           5601                                                                                                 5700
     pET3  GTGTTCATGA ACAAAGCGGA TATGGTTGAT GACCCTGAGT TATTAGAGTT AGTGGAAATG GAAGTGCGAG ATTTATTAAG CAGTTACGAT TTCCCAGGGG
      Seq  GTGTTCATGA ACAAAGCGGA TATGGTTGAT GACCCTGAGT TATTAGAGTT AGTGGAAATG GAAGTGCGAG ATTTATTAAG CAGTTACGAT TTCCCAGGGG
Consensus  GTGTTCATGA ACAAAGCGGA TATGGTTGAT GACCCTGAGT TATTAGAGTT AGTGGAAATG GAAGTGCGAG ATTTATTAAG CAGTTACGAT TTCCCAGGGG

           5701                                                                                                 5800
     pET3  ATGACATACC TATTGTTGTT GGTTCAGCTT TGAAAGCATT GGAAGGTGAA GACAGTGATA TAGGCGTTAA GGCTATAGAG AAATTGGTTG AAACAATGGA
      Seq  ATGACATACC TATTGTTGTT GGTTCAGCTT TGAAAGCATT GGAAGGTGAA GACAGTGATA TAGGCGTTAA GGCTATAGAG AAATTGGTTG AAACAATGGA
Consensus  ATGACATACC TATTGTTGTT GGTTCAGCTT TGAAAGCATT GGAAGGTGAA GACAGTGATA TAGGCGTTAA GGCTATAGAG AAATTGGTTG AAACAATGGA

           5801                                                                                                 5900
     pET3  TTCATACATT CCTGAGCCAG TTAGAAACAT AGACAAGCCA TTTTTGTTAC CGATTGAAGA CGTATTTTCA ATTTCTGGAC GCGGAACAGT GGTAACTGGT
      Seq  TTCATACATT CCTGAGCCAG TTAGAAACAT AGACAAGCCA TTTTTGTTAC CGATTGAAGA CGTATTTTCA ATTTCTGGAC GCGGAACAGT GGTAACTGGT
Consensus  TTCATACATT CCTGAGCCAG TTAGAAACAT AGACAAGCCA TTTTTGTTAC CGATTGAAGA CGTATTTTCA ATTTCTGGAC GCGGAACAGT GGTAACTGGT

           5901                                                                                                 6000
     pET3  CGTGTTGAGA GTGGAATTGT TAAAGTTGGT GAGGAAGTTG AAATTGTTGG AATAAGAGAC ACTCAAAAGA CGACTTGTAC GGGTGTTGAG ATGTTCCGTA
      Seq  CGTGTTGAGA GTGGAATTGT TAAAGTTGGT GAGGAAGTTG AAATTGTTGG AATAAGAGAC ACTCAAAAGA CGACTTGTAC GGGTGTTGAG ATGTTCCGTA
Consensus  CGTGTTGAGA GTGGAATTGT TAAAGTTGGT GAGGAAGTTG AAATTGTTGG AATAAGAGAC ACTCAAAAGA CGACTTGTAC GGGTGTTGAG ATGTTCCGTA

           6001                                                                                                 6100
     pET3  AATTACTTGA TGAAGGTCGA GCTGGTGATA ACGTTGGAGT GTTATTACGA GGTACGAAGC GAGATGAAGT GGAGCGTGGA CAGGTATTGG CAAAGCCAGG
      Seq  AATTACTTGA TGAAGGTCGA GCTGGTGATA ACGTTGGAGT GTTATTACGA GGTACGAAGC GAGATGAAGT GGAGCGTGGA CAGGTATTGG CAAAGCCAGG
Consensus  AATTACTTGA TGAAGGTCGA GCTGGTGATA ACGTTGGAGT GTTATTACGA GGTACGAAGC GAGATGAAGT GGAGCGTGGA CAGGTATTGG CAAAGCCAGG

           6101                                                                                                 6200
     pET3  TACCATCAAG CCACACACCA AGTTTGAAGC AGAAGTGTAT GTGTTATCCA AGGAAGAAGG CGGACGTCAC ACATCATTCT TTAATGGATA CCGTCCACAA
      Seq  TACCATCAAG CCACACACCA AGTTTGAAGC AGAAGTGTAT GTGTTATCCA AGGAAGAAGG CGGACGTCAC ACATCATTCT TTAATGGATA CCGTCCACAA
Consensus  TACCATCAAG CCACACACCA AGTTTGAAGC AGAAGTGTAT GTGTTATCCA AGGAAGAAGG CGGACGTCAC ACATCATTCT TTAATGGATA CCGTCCACAA

           6201                                                                                                 6300
     pET3  TTCTATTTCA GAACCACTGA CGTGACAGGT ACTTGTGACT TGCCATCAGG AGTTGAAATG GTAATGCCTG GAGATAATGT GCAATTAGTT GTTAGCTTGC

      Seq  TTCTATTTCA GAACCACTGA CGTGACAGGT ACTTGTGACT TGCCATCAGG AGTTGAAATG GTAATGCCTG GAGATAATGT GCAATTAGTT GTTAGCTTGC
Consensus  TTCTATTTCA GAACCACTGA CGTGACAGGT ACTTGTGACT TGCCATCAGG AGTTGAAATG GTAATGCCTG GAGATAATGT GCAATTAGTT GTTAGCTTGC

           6301                                                                                                 6400
     pET3  ATGCTCCGAT TGCGATGGAT GAAGGTTTAA GATTCGCAAT TAGAGAGGGT GGCCGAACTG TTGGCGCCGG TGTAGTCGCT AAAATAATCG AGCTCGAGCA
      Seq  ATGCTCCGAT TGCGATGGAT GAAGGTTTAA GATTCGCAAT TAGAGAGGGT GGCCGAACTG TTGGCGCCGG TGTAGTCGCT AAAATAATCG AG
Consensus  ATGCTCCGAT TGCGATGGAT GAAGGTTTAA GATTCGCAAT TAGAGAGGGT GGCCGAACTG TTGGCGCCGG TGTAGTCGCT AAAATAATCG AG........

           6401                                                                                                 6500
     pET3  CCACCACCAC CACCACTGAG ATCCGGCTGC TAACAAAGCC CGAAAGGAAG CTGAGTTGGC TGCTGCCACC GCTGAGCAAT AACTAGCATA ACCCCTTGGG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           6501                                          6555
     pET3  GCCTCTAAAC GGGTCTTGAG GGGTTTTTTG CTGAAAGGAG GAACTATATC CGGAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .....
```

pET22b(+)-lpg1841

```
           1                                                                                                   100
     pET4  TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           101                                                                                                 200
     pET4  CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           201                                                                                                 300
     pET4  GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           301                                                                                                 400
     pET4  CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACACTC AACCCTATCT CGGTCTATTC TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTC GGCCTATTGG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           401                                                                                                 500
     pET4  TTAAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAAT ATTAACGTTT ACAATTTCAG GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           501                                                                                                 600
     pET4  CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA GGAAGAGTAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           601                                                                                                 700
     pET4  GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           701                                                                                                 800
     pET4  GAAGATCAGT TGGGTGCACG AGTGGGTTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT TTCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           801                                                                                                 900
     pET4  GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTCG CCGCATACAC TATTCTCAGA ATGACTTGGT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           901                                                                                                1000
     pET4  TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TGCGGCCAAC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1001                                                                                               1100
     pET4  TTACTTCTGA CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA CTCGCCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1101                                                                                               1200
     pET4  ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC TGCAGCAATG GCAACAACGT TGCGCAAACT ATTAACTGGC GAACTACTTA CTCTAGCTTC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
```

```
          1201                                                                                                1300
     pET4 CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1301                                                                                                1400
     pET4 GCCGGTGAGC GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1401                                                                                                1500
     pET4 TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAAC TGTCAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT AGATTGATTT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1501                                                                                                1600
     pET4 AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1601                                                                                                1700
     pET4 GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1701                                                                                                1800
     pET4 GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1801                                                                                                1900
     pET4 CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1901                                                                                                2000
     pET4 TTGGACTCAA GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGGTTCG TGCACACAGC CCAGCTTGGA GCGAACGACC TACACCGAAC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2001                                                                                                2100
     pET4 TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2101                                                                                                2200
     pET4 CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCCTG GTATCTTTAT AGTCCTGTCG GGTTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2201                                                                                                2300
     pET4 GGGCGGAGCC TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG CTCACATGTT CTTTCCTGCG TTATCCCCTG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2301                                                                                                2400
     pET4 ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG AGTGAGCTGA TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCA GTGAGCGAGG AAGCGGAAGA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2401                                                                                                2500
     pET4 GCGCCTGATG CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTCACACC GCATATATGG TGCACTCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCC GCATAGTTAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2501                                                                                                2600
     pET4 GCCAGTATAC ACTCCGCTAT CGCTACGTGA CTGGGTCATG GCTGCGCCCC GACACCCGCC AACACCCGCT GACGCGCCCT GACGGGCTTG TCTGCTCCCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2601                                                                                                2700
     pET4 GCATCCGCTT ACAGACAAGC TGTGACCGTC TCCGGGAGCT GCATGTGTCA GAGGTTTTCA CCGTCATCAC CGAAACGCGC GAGGCAGCTG CGGTAAAGCT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2701                                                                                                2800
     pET4 CATCAGCGTG GTCGTGAAGC GATTCACAGA TGTCTGCCTG TTCATCCGCG TCCAGCTCGT TGAGTTTCTC CAGAAGCGTT AATGTCTGGC TTCTGATAAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2801                                                                                                2900
     pET4 GCGGGCCATG TTAAGGGCGG TTTTTTCCTG TTTGGTCACT GATGCCTCCG TGTAAGGGGG ATTTCTGTTC ATGGGGGTAA TGATACCGAT GAAACGAGAG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........
```

```
          2901                                                                                                3000
     pET4 AGGATGCTCA CGATACGGGT TACTGATGAT GAACATGCCC GGTTACTGGA ACGTTGTGAG GGTAAACAAC TGGCGGTATG GATGCGGCGG GACCAGAGAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3001                                                                                                3100
     pET4 AAATCACTCA GGGTCAATGC CAGCGCTTCG TTAATACAGA TGTAGGTGTT CCACAGGGTA GCCAGCAGCA TCCTGCGATG CAGATCCGGA ACATAATGGT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3101                                                                                                3200
     pET4 GCAGGGCGCT GACTTCCGCG TTTCCAGACT TTACGAAACA CGGAAACCGA AGACCATTCA TGTTGTTGCT CAGGTCGCAG ACGTTTTGCA GCAGCAGTCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3201                                                                                                3300
     pET4 CTTCACGTTC GCTCGCGTAT CGGTGATTCA TTCTGCTAAC CAGTAAGGCA ACCCCGCCAG CCTAGCCGGG TCCTCAACGA CAGGAGCACG ATCATGCGCA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3301                                                                                                3400
     pET4 CCCGTGGGGC CGCCATGCCG GCGATAATGG CCTGCTTCTC GCCGAAACGT TTGGTGGCGG GACCAGTGAC GAAGGCTTGA GCGAGGGCGT GCAAGATTCC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3401                                                                                                3500
     pET4 GAATACCGCA AGCGACAGGC CGATCATCGT CGCGCTCCAG CGAAAGCGGT CCTCGCCGAA AATGACCCAG AGCGCTGCCG GCACCTGTCC TACGAGTTGC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3501                                                                                                3600
     pET4 ATGATAAAGA AGACAGTCAT AAGTGCGGCG ACGATAGTCA TGCCCCGCGC CCACCGGAAG GAGCTGACTG GGTTGAAGGC TCTCAAGGGC ATCGGTCGAG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3601                                                                                                3700
     pET4 ATCCCGGTGC CTAATGAGTG AGCTAACTTA CATTAATTGC GTTGCGCTCA CTGCCCGCTT TCCAGTCGGG AAACCTGTCG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3701                                                                                                3800
     pET4 CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG TATTGGGCGC CAGGGTGGTT TTTCTTTTCA CCAGTGAGAC GGGCAACAGC TGATTGCCCT TCACCGCCTG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3801                                                                                                3900
     pET4 GCCCTGAGAG AGTTGCAGCA AGCGGTCCAC GCTGGTTTGC CCCAGCAGGC GAAAATCCTG TTTGATGGTG GTTAACGGCG GGATATAACA TGAGCTGTCT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3901                                                                                                4000
     pET4 TCGGTATCGT CGTATCCCAC TACCGAGATA TCCGCACCAA CGCGCAGCCC GGACTCGGTA ATGGCGCGCA TTGCGCCCAG CGCCATCTGA TCGTTGGCAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4001                                                                                                4100
     pET4 CCAGCATCGC AGTGGGAACG ATGCCCTCAT TCAGCATTTG CATGGTTTGT TGAAAACCGG ACATGGCACT CCAGTCGCCT TCCCGTTCCG CTATCGGCTG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4101                                                                                                4200
     pET4 AATTTGATTG CGAGTGAGAT ATTTATGCCA GCCAGCCAGA CGCAGACGCG CCGAGACAGA ACTTAATGGG CCCGCTAACA GCGCGATTTG CTGGTGACCC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4201                                                                                                4300
     pET4 AATGCGACCA GATGCTCCAC GCCCAGTCGC GTACCGTCTT CATGGGAGAA AATAATACTG TTGATGGGTG TCTGGTCAGA GACATCAAGA AATAACGCCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4301                                                                                                4400
     pET4 GAACATTAGT GCAGGCAGCT TCCACAGCAA TGGCATCCTG GTCATCCAGC GGATAGTTAA TGATCAGCCC ACTGACGCGT TGCGCGAGAA GATTGTGCAC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4401                                                                                                4500
     pET4 CGCCGCTTTA CAGGCTTCGA CGCCGCTTCG TTCTACCATC GACACCACCA CGCTGGCACC CAGTTGATCG GCGCGAGATT TAATCGCCGC GACAATTTGC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4501                                                                                                4600
     pET4 GACGGCGCGT GCAGGGCCAG ACTGGAGGTG GCAACGCCAA TCAGCAACGA CTGTTTGCCC GCCAGTTGTT GTGCCACGCG GTTGGGAATG TAATTCAGCT
      Seq
```

```
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4601                                                                                                 4700
     pET4  CCGCCATCGC CGCTTCCACT TTTTCCCGCG TTTTCGCAGA AACGTGGCTG GCCTGGTTCA CCACGCGGGA AACGGTCTGA TAAGAGACAC CGGCATACTC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4701                                                                                                 4800
     pET4  TGCGACATCG TATAACGTTA CTGGTTTCAC ATTCACCACC CTGAATTGAC TCTCTTCCGG GCGCTATCAT GCCATACCGC GAAAGGTTTT GCGCCATTCG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4801                                                                                                 4900
     pET4  ATGGTGTCCG GGATCTCGAC GCTCTCCCTT ATGCGACTCC TGCATTAGGA AGCAGCCCAG TAGTAGGTTG AGGCCGTTGA GCACCGCCGC CGCAAGGAAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4901                                                                                                 5000
     pET4  GGTGCATGCA AGGAGATGGC GCCCAACAGT CCCCCGGCCA CGGGGCCTGC CACCATACCC ACGCCGAAAC AAGCGCTCAT GAGCCCGAAG TGGCGAGCCC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5001                                                                                                 5100
     pET4  GATCTTCCCC ATCGGTGATG TCGGCGATAT AGGCGCCAGC AACCGCACCT GTGGCGCCGG TGATGCCGGC CACGATGCGT CCGGCGTAGA GGATCGAGAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5101                                                                                                 5200
     pET4  CTCGATCCCG CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTCC CCTCTAGAAA TAATTTTGTT TAACTTTAAG AAGGAGATAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5201                                                                                                 5300
     pET4  ACATATGAAA TTTACAAGTT TATTAACAGC TGGAGCATTA GCCTCTACAT TAGTATCACC TGCAATAATG GCGGCTGATA CGGCTAGCGC TTCTTTATCA
      Seq        AAA TTTACAAGTT TATTAACAGC TGGAGCATTA GCCTCTACAT TAGTATCACC TGCAATAATG GCGGCTGATA CGGCTAGCGC TTCTTTATCA
Consensus  .......AAA TTTACAAGTT TATTAACAGC TGGAGCATTA GCCTCTACAT TAGTATCACC TGCAATAATG GCGGCTGATA CGGCTAGCGC TTCTTTATCA

           5301                                                                                                 5400
     pET4  GATGCCCAAA AAAAGGAAAT TGAAAAAGTC ATTCATGATT ATCTGATTAA TAACCCGGAA GTTTTATTGG AGGCTTCGCA AGCATTACAA CAAAAACAGC
      Seq  GATGCCCAAA AAAAGGAAAT TGAAAAAGTC ATTCATGATT ATCTGATTAA TAACCCGGAA GTTTTATTGG AGGCTTCGCA AGCATTACAA CAAAAACAGC
Consensus  GATGCCCAAA AAAAGGAAAT TGAAAAAGTC ATTCATGATT ATCTGATTAA TAACCCGGAA GTTTTATTGG AGGCTTCGCA AGCATTACAA CAAAAACAGC

           5401                                                                                                 5500
     pET4  AGCAAAATAT GCAACAGCAA GCTCAAGCTG CAATTCAGGA AAATGCTGAA CAGGTTTTTC AAGGCAAATT AACTACTGTA GGTAATCCTA AAGGGAATGT
      Seq  AGCAAAATAT GCAACAGCAA GCTCAAGCTG CAATTCAGGA AAATGCTGAA CAGGTTTTTC AAGGCAAATT AACTACTGTA GGTAATCCTA AAGGGAATGT
Consensus  AGCAAAATAT GCAACAGCAA GCTCAAGCTG CAATTCAGGA AAATGCTGAA CAGGTTTTTC AAGGCAAATT AACTACTGTA GGTAATCCTA AAGGGAATGT

           5501                                                                                                 5600
     pET4  AACACTGGTT GAGTTTTTTG ATTATCAATG CATTCATTGC AAAAAAATGG CATCTACCAT TGAAAATCTG GTTAAAAAAG ACAGCGGATT ACGAGTTATA
      Seq  AACACTGGTT GAGTTTTTTG ATTATCAATG CATTCATTGC AAAAAAATGG CATCTACCAT TGAAAATCTG GTTAAAAAAG ACAGCGGATT ACGAGTTATA
Consensus  AACACTGGTT GAGTTTTTTG ATTATCAATG CATTCATTGC AAAAAAATGG CATCTACCAT TGAAAATCTG GTTAAAAAAG ACAGCGGATT ACGAGTTATA

           5601                                                                                                 5700
     pET4  TACAAAGAAT TTCCAATCTT TGGCAAGACT TCTGATCTGG CTTCCAGAGT TGCTCTGGCG GCTGGCATGC AAGGAAAATA TCAGGCTATG CATAATGCTT
      Seq  TACAAAGAAT TTCCAATCTT TGGCAAGACT TCTGATCTGG CTTCCAGAGT TGCTCTGGCG GCTGGCATGC AAGGAAAATA TCAGGCTATG CATAATGCTT
Consensus  TACAAAGAAT TTCCAATCTT TGGCAAGACT TCTGATCTGG CTTCCAGAGT TGCTCTGGCG GCTGGCATGC AAGGAAAATA TCAGGCTATG CATAATGCTT

           5701                                                                                                 5800
     pET4  TGATTACGAT AGACAAACGT TTGGATGAAA AAACAGTGAT GGATGCCGCC AAATCCATAG GTCTGGATAT GCAAAAACTG AAAAAAGATA TGGATAGTCA
      Seq  TGATTACGAT AGACAAACGT TTGGATGAAA AAACAGTGAT GGATGCCGCC AAATCCATAG GTCTGGATAT GCAAAAACTG AAAAAAGATA TGGATAGTCA
Consensus  TGATTACGAT AGACAAACGT TTGGATGAAA AAACAGTGAT GGATGCCGCC AAATCCATAG GTCTGGATAT GCAAAAACTG AAAAAAGATA TGGATAGTCA

           5801                                                                                                 5900
     pET4  GGAAGTGACC GATATCCTGG ATGCGAATCG CCAACTGGCT GAAAAATTAC ATTTGATGGG TACACCAGCC TTTATAATTG GCTCAACACC AGATGGGCAA
      Seq  GGAAGTGACC GATATCCTGG ATGCGAATCG CCAACTGGCT GAAAAATTAC ATTTGATGGG TACACCAGCC TTTATAATTG GCTCAACACC AGATGGGCAA
Consensus  GGAAGTGACC GATATCCTGG ATGCGAATCG CCAACTGGCT GAAAAATTAC ATTTGATGGG TACACCAGCC TTTATAATTG GCTCAACACC AGATGGGCAA

           5901                                                                                                 6000
     pET4  TATAAAAAGG GCAGTGAAAT ATCATTTATA CCAGGCGCTA CAAGCGAGCA ATCACTACGT GAGTTAATTA AAAAGGCGGC TGGCAATCTC GAGCACCACC
      Seq  TATAAAAAGG GCAGTGAAAT ATCATTTATA CCAGGCGCTA CAAGCGAGCA ATCACTACGT GAGTTAATTA AAAAGGCGGC TGGCAAT
Consensus  TATAAAAAGG GCAGTGAAAT ATCATTTATA CCAGGCGCTA CAAGCGAGCA ATCACTACGT GAGTTAATTA AAAAGGCGGC TGGCAAT... ..........

           6001                                                                                                 6100
     pET4  ACCACCACCA CTGAGATCCG GCTGCTAACA AAGCCCGAAA GGAAGCTGAG TTGGCTGCTG CCACCGCTGA GCAATAACTA GCATAACCCC TTGGGGCCTC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           6101                                          6150
     pET4  TAAACGGGTC TTGAGGGGTT TTTTGCTGAA AGGAGGAACT ATATCCGGAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... ..........
```

pET22b(+)-lpg0327

```
           1                                                                                                  100
     pET8  TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           101                                                                                                 200
     pET8  CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           201                                                                                                 300
     pET8  GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           301                                                                                                 400
     pET8  CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACACTC AACCCTATCT CGGTCTATTC TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTC GGCCTATTGG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           401                                                                                                 500
     pET8  TTAAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAAT ATTAACGTTT ACAATTTCAG GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           501                                                                                                 600
     pET8  CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA GGAAGAGTAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           601                                                                                                 700
     pET8  GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           701                                                                                                 800
     pET8  GAAGATCAGT TGGGTGCACG AGTGGGTTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT TTCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           801                                                                                                 900
     pET8  GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTCG CCGCATACAC TATTCTCAGA ATGACTTGGT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           901                                                                                                1000
     pET8  TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TGCGGCCAAC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1001                                                                                               1100
     pET8  TTACTTCTGA CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA CTCGCCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           1101                                                                                               1200
     pET8  ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC TGCAGCAATG GCAACAACGT TGCGCAAACT ATTAACTGGC GAACTACTTA CTCTAGCTTC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
```

```
          1201                                                                                                1300
     pET8 CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1301                                                                                                1400
     pET8 GCCGGTGAGC GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1401                                                                                                1500
     pET8 TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAAC TGTCAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT AGATTGATTT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1501                                                                                                1600
     pET8 AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1601                                                                                                1700
     pET8 GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1701                                                                                                1800
     pET8 GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1801                                                                                                1900
     pET8 CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1901                                                                                                2000
     pET8 TTGGACTCAA GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGGTTCG TGCACACAGC CCAGCTTGGA GCGAACGACC TACACCGAAC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2001                                                                                                2100
     pET8 TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2101                                                                                                2200
     pET8 CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCCTG GTATCTTTAT AGTCCTGTCG GGTTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2201                                                                                                2300
     pET8 GGGCGGAGCC TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG CTCACATGTT CTTTCCTGCG TTATCCCCTG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2301                                                                                                2400
     pET8 ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG AGTGAGCTGA TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCA GTGAGCGAGG AAGCGGAAGA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2401                                                                                                2500
     pET8 GCGCCTGATG CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTCACACC GCATATATGG TGCACTCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCC GCATAGTTAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2501                                                                                                2600
     pET8 GCCAGTATAC ACTCCGCTAT CGCTACGTGA CTGGGTCATG GCTGCGCCCC GACACCCGCC AACACCCGCT GACGCGCCCT GACGGGCTTG TCTGCTCCCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2601                                                                                                2700
     pET8 GCATCCGCTT ACAGACAAGC TGTGACCGTC TCCGGGAGCT GCATGTGTCA GAGGTTTTCA CCGTCATCAC CGAAACGCGC GAGGCAGCTG CGGTAAAGCT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2701                                                                                                2800
     pET8 CATCAGCGTG GTCGTGAAGC GATTCACAGA TGTCTGCCTG TTCATCCGCG TCCAGCTCGT TGAGTTTCTC CAGAAGCGTT AATGTCTGGC TTCTGATAAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2801                                                                                                2900
     pET8 GCGGGCCATG TTAAGGGCGG TTTTTTCCTG TTTGGTCACT GATGCCTCCG TGTAAGGGGG ATTTCTGTTC ATGGGGGTAA TGATACCGAT GAAACGAGAG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........
```

```
          1201                                                                                                1300
     pET8 CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1301                                                                                                1400
     pET8 GCCGGTGAGC GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1401                                                                                                1500
     pET8 TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAAC TGTCAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT AGATTGATTT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1501                                                                                                1600
     pET8 AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1601                                                                                                1700
     pET8 GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1701                                                                                                1800
     pET8 GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1801                                                                                                1900
     pET8 CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1901                                                                                                2000
     pET8 TTGGACTCAA GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGGTTCG TGCACACAGC CCAGCTTGGA GCGAACGACC TACACCGAAC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2001                                                                                                2100
     pET8 TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2101                                                                                                2200
     pET8 CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCCTG GTATCTTTAT AGTCCTGTCG GGTTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2201                                                                                                2300
     pET8 GGGCGGAGCC TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG CTCACATGTT CTTTCCTGCG TTATCCCCTG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2301                                                                                                2400
     pET8 ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG AGTGAGCTGA TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCA GTGAGCGAGG AAGCGGAAGA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2401                                                                                                2500
     pET8 GCGCCTGATG CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTCACACC GCATATATGG TGCACTCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCC GCATAGTTAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2501                                                                                                2600
     pET8 GCCAGTATAC ACTCCGCTAT CGCTACGTGA CTGGGTCATG GCTGCGCCCC GACACCCGCC AACACCCGCT GACGCGCCCT GACGGGCTTG TCTGCTCCCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2601                                                                                                2700
     pET8 GCATCCGCTT ACAGACAAGC TGTGACCGTC TCCGGGAGCT GCATGTGTCA GAGGTTTTCA CCGTCATCAC CGAAACGCGC GAGGCAGCTG CGGTAAAGCT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2701                                                                                                2800
     pET8 CATCAGCGTG GTCGTGAAGC GATTCACAGA TGTCTGCCTG TTCATCCGCG TCCAGCTCGT TGAGTTTCTC CAGAAGCGTT AATGTCTGGC TTCTGATAAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2801                                                                                                2900
     pET8 GCGGGCCATG TTAAGGGCGG TTTTTTCCTG TTTGGTCACT GATGCCTCCG TGTAAGGGGG ATTTCTGTTC ATGGGGGTAA TGATACCGAT GAAACGAGAG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........
```

```
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4601                                                                                              4700
     pET8  CCGCCATCGC CGCTTCCACT TTTTCCCGCG TTTTCGCAGA AACGTGGCTG GCCTGGTTCA CCACGCGGGA AACGGTCTGA TAAGAGACAC CGGCATACTC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4701                                                                                              4800
     pET8  TGCGACATCG TATAACGTTA CTGGTTTCAC ATTCACCACC CTGAATTGAC TCTCTTCCGG GCGCTATCAT GCCATACCGC GAAAGGTTTT GCGCCATTCG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4801                                                                                              4900
     pET8  ATGGTGTCCG GGATCTCGAC GCTCTCCCTT ATGCGACTCC TGCATTAGGA AGCAGCCCAG TAGTAGGTTG AGGCCGTTGA GCACCGCCGC CGCAAGGAAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4901                                                                                              5000
     pET8  GGTGCATGCA AGGAGATGGC GCCCAACAGT CCCCCGGCCA CGGGGCCTGC CACCATACCC ACGCCGAAAC AAGCGCTCAT GAGCCCGAAG TGGCGAGCCC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5001                                                                                              5100
     pET8  GATCTTCCCC ATCGGTGATG TCGGCGATAT AGGCGCCAGC AACCGCACCT GTGGCGCCGG TGATGCCGGC CACGATGCGT CCGGCGTAGA GGATCGAGAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5101                                                                                              5200
     pET8  CTCGATCCCG CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTCC CCTCTAGAAA TAATTTTGTT TAACTTTAAG AAGGAGATAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5201                                                                                              5300
     pET8  ACATATGGCG AAGGAAAAAT TTGAACGTAA GAAGCCGCAC GTAAACGTGG GCACGATTGG TCACGTAGAC CATGGCAAGA CGACATTGAC AGCAGCTATT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5301                                                                                              5400
     pET8  ACAACGATTA TGGCGAAGAA ATATGGTGGT ACAGCGAAGG CGTACGATCA AATTGATGCT GCGCCAGAAG AAAGAGAGCG TGGTATTACT ATTTCTACAG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5401                                                                                              5500
     pET8  CACACGTTGA GTACGAATCA GCGAGCAGAC ATTATGCGCA CGTAGACTGC CCGGGGCATG CTGACTATGT TAAGAACATG ATTACTGGTG CTGCGCAAAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5501                                                                                              5600
     pET8  GGACGGAGCG ATACTGGTTG TATCAGCAGC TGATGGTCCT ATGCCACAAA CGAGGGAACA CATTCTATTG TCTCGCCAGG TAGGTGTTCC ATATATTGTT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5601                                                                                              5700
     pET8  GTGTTCATGA ACAAAGCGGA TATGGTTGAT GACCCTGAGT TATTAGAGTT AGTGGAAATG GAAGTGCGAG ATTTATTAAG CAGTTACGAT TTCCCAGGGG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5701                                                                                              5800
     pET8  ATGACATACC TATTGTTGTT GGTTCAGCTT TGAAAGCATT GGAAGGTGAA GACAGTGATA TAGGCGTTAA GGCTATAGAG AAATTGGTTG AAACAATGGA
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5801                                                                                              5900
     pET8  TTCATACATT CCTGAGCCAG TTAGAAACAT AGACAAGCCA TTTTTGTTAC CGATTGAAGA CGTATTTTCA ATTTCTGGAC GCGGAACAGT GGTAACTGGT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5901                                                                                              6000
     pET8  CGTGTTGAGA GTGGAATTGT TAAAGTTGGT GAGGAAGTTG AAATTGTTGG AATAAGAGAC ACCCAAAAGA CGACTTGTAC GGGTGTTGAG ATGTTCCGTA
      Seq                                              GG AATAAGAGAC ACCCAAAAGA CGACTTGTAC GGGTGTTGAG ATGTTCCGTA
Consensus  .......... .......... .......... .......... ........GG AATAAGAGAC ACCCAAAAGA CGACTTGTAC GGGTGTTGAG ATGTTCCGTA

           6001                                                                                              6100
     pET8  AATTACTTGA TGAAGGTCGA GCTGGTGATA ACGTTGGAGT GTTATTACGA GGTACGAAGC GAGATGAAGT GGAGCGTGGA CAGGTATTGG CAAAGCCAGG
      Seq  AATTACTTGA TGAAGGTCGA GCTGGTGATA ACGTTGGAGT GTTATTACGA GGTACGAAGC GAGATGAAGT GGAGCGTGGA CAGGTATTGG CAAAGCCAGG
Consensus  AATTACTTGA TGAAGGTCGA GCTGGTGATA ACGTTGGAGT GTTATTACGA GGTACGAAGC GAGATGAAGT GGAGCGTGGA CAGGTATTGG CAAAGCCAGG

           6101                                                                                              6200
     pET8  TACCATCAAG CCACACACCA AGTTTGAAGC AGAAGTGTAT GTGTTATCCA AGGAAGAAGG CGGACGTCAC ACACCATTCT TTAATGGATA CCGTCCACAA
      Seq  TACCATCAAG CCACACACCA AGTTTGAAGC AGAAGTGTAT GTGTTATCCA AGGAAGAAGG CGGACGTCAC ACACCATTCT TTAATGGATA CCGTCCACAA
Consensus  TACCATCAAG CCACACACCA AGTTTGAAGC AGAAGTGTAT GTGTTATCCA AGGAAGAAGG CGGACGTCAC ACACCATTCT TTAATGGATA CCGTCCACAA

           6201                                                                                              6300
     pET8  TTCTATTTCA GAACCACTGA CGTGACAGGT ACTTGTGACT TGCCATCAGG AGTTGAAATG GTAATGCCTG GAGATAATGT GCAATTAGTT GTTAGCTTGC

      Seq  TTCTATTTCA GAACCACTGA CGTGACAGGT ACTTGTGACT TGCCATCAGG AGTTGAAATG GTAATGCCTG GAGATAATGT GCAATTAGTT GTTAGCTTGC
Consensus  TTCTATTTCA GAACCACTGA CGTGACAGGT ACTTGTGACT TGCCATCAGG AGTTGAAATG GTAATGCCTG GAGATAATGT GCAATTAGTT GTTAGCTTGC

           6301                                                                                              6400
     pET8  ATGCTCCGAT TGCGATGGAT GAAGGTTTAA GATTCGCAAT TAGAGAGGGT GGCCGAACTG TTGGCGCCGG TGTAGTCGCT AAAATAATCG AGCTCGAGCA
      Seq  ATGCTCCGAT TGCGATGGAT GAAGGTTTAA GATTCGCAAT TAGAGAGGGT GGCCGAACTG TTGGCGCCGG TGTAGTCGCT AAAATAATCG AG
Consensus  ATGCTCCGAT TGCGATGGAT GAAGGTTTAA GATTCGCAAT TAGAGAGGGT GGCCGAACTG TTGGCGCCGG TGTAGTCGCT AAAATAATCG AG........

           6401                                                                                              6500
     pET8  CCACCACCAC CACCACTGAG ATCCGGCTGC TAACAAAGCC CGAAAGGAAG CTGAGTTGGC TGCTGCCACC GCTGAGCAAT AACTAGCATA ACCCCTTGGG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           6501                                          6555
     pET8  GCCTCTAAAC GGGTCTTGAG GGGTTTTTTG CTGAAAGGAG GAACTATATC CGGAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .....
```

pET22b(+)-lpg0533

```
          1                                                                                                   100
    pET9  TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          101                                                                                                 200
    pET9  CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          201                                                                                                 300
    pET9  GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          301                                                                                                 400
    pET9  CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACACTC AACCCTATCT CGGTCTATTC TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTC GGCCTATTGG
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          401                                                                                                 500
    pET9  TTAAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAAT ATTAACGTTT ACAATTTCAG GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          501                                                                                                 600
    pET9  CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA GGAAGAGTAT
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          601                                                                                                 700
    pET9  GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          701                                                                                                 800
    pET9  GAAGATCAGT TGGGTGCACG AGTGGGTTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT TTCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          801                                                                                                 900
    pET9  GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTCG CCGCATACAC TATTCTCAGA ATGACTTGGT
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          901                                                                                                1000
    pET9  TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TGCGGCCAAC
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          1001                                                                                               1100
    pET9  TTACTTCTGA CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA CTCGCCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

          1101                                                                                               1200
    pET9  ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC TGCAGCAATG GCAACAACGT TGCGCAAACT ATTAACTGGC GAACTACTTA CTCTAGCTTC
     Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........
```

```
          1201                                                                                                1300
     pET9 CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1301                                                                                                1400
     pET9 GCCGGTGAGC GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1401                                                                                                1500
     pET9 TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAAC TGTCAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT AGATTGATTT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1501                                                                                                1600
     pET9 AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1601                                                                                                1700
     pET9 GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1701                                                                                                1800
     pET9 GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1801                                                                                                1900
     pET9 CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1901                                                                                                2000
     pET9 TTGGACTCAA GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGGTTCG TGCACACAGC CCAGCTTGGA GCGAACGACC TACACCGAAC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2001                                                                                                2100
     pET9 TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2101                                                                                                2200
     pET9 CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCCTG GTATCTTTAT AGTCCTGTCG GGTTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2201                                                                                                2300
     pET9 GGGCGGAGCC TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG CTCACATGTT CTTTCCTGCG TTATCCCCTG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2301                                                                                                2400
     pET9 ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG AGTGAGCTGA TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCA GTGAGCGAGG AAGCGGAAGA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2401                                                                                                2500
     pET9 GCGCCTGATG CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTCACACC GCATATATGG TGCACTCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCC GCATAGTTAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2501                                                                                                2600
     pET9 GCCAGTATAC ACTCCGCTAT CGCTACGTGA CTGGGTCATG GCTGCGCCCC GACACCCGCC AACACCCGCT GACGCGCCCT GACGGGCTTG TCTGCTCCCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2601                                                                                                2700
     pET9 GCATCCGCTT ACAGACAAGC TGTGACCGTC TCCGGGAGCT GCATGTGTCA GAGGTTTTCA CCGTCATCAC CGAAACGCGC GAGGCAGCTG CGGTAAAGCT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2701                                                                                                2800
     pET9 CATCAGCGTG GTCGTGAAGC GATTCACAGA TGTCTGCCTG TTCATCCGCG TCCAGCTCGT TGAGTTTCTC CAGAAGCGTT AATGTCTGGC TTCTGATAAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2801                                                                                                2900
     pET9 GCGGGCCATG TTAAGGGCGG TTTTTTCCTG TTTGGTCACT GATGCCTCCG TGTAAGGGGG ATTTCTGTTC ATGGGGGTAA TGATACCGAT GAAACGAGAG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........
```

```
          2901                                                                                                3000
     pET9 AGGATGCTCA CGATACGGGT TACTGATGAT GAACATGCCC GGTTACTGGA ACGTTGTGAG GGTAAACAAC TGGCGGTATG GATGCGGCGG GACCAGAGAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3001                                                                                                3100
     pET9 AAATCACTCA GGGTCAATGC CAGCGCTTCG TTAATACAGA TGTAGGTGTT CCACAGGGTA GCCAGCAGCA TCCTGCGATG CAGATCCGGA ACATAATGGT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3101                                                                                                3200
     pET9 GCAGGGCGCT GACTTCCGCG TTTCCAGACT TTACGAAACA CGGAAACCGA AGACCATTCA TGTTGTTGCT CAGGTCGCAG ACGTTTTGCA GCAGCAGTCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3201                                                                                                3300
     pET9 CTTCACGTTC GCTCGCGTAT CGGTGATTCA TTCTGCTAAC CAGTAAGGCA ACCCCGCCAG CCTAGCCGGG TCCTCAACGA CAGGAGCACG ATCATGCGCA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3301                                                                                                3400
     pET9 CCCGTGGGGC CGCCATGCCG GCGATAATGG CCTGCTTCTC GCCGAAACGT TTGGTGGCGG GACCAGTGAC GAAGGCTTGA GCGAGGGCGT GCAAGATTCC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3401                                                                                                3500
     pET9 GAATACCGCA AGCGACAGGC CGATCATCGT CGCGCTCCAG CGAAAGCGGT CCTCGCCGAA AATGACCCAG AGCGCTGCCG GCACCTGTCC TACGAGTTGC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3501                                                                                                3600
     pET9 ATGATAAAGA AGACAGTCAT AAGTGCGGCG ACGATAGTCA TGCCCCGCGC CCACCGGAAG GAGCTGACTG GGTTGAAGGC TCTCAAGGGC ATCGGTCGAG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3601                                                                                                3700
     pET9 ATCCCGGTGC CTAATGAGTG AGCTAACTTA CATTAATTGC GTTGCGCTCA CTGCCCGCTT TCCAGTCGGG AAACCTGTCG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3701                                                                                                3800
     pET9 CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG TATTGGGCGC CAGGGTGGTT TTTCTTTTCA CCAGTGAGAC GGGCAACAGC TGATTGCCCT TCACCGCCTG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3801                                                                                                3900
     pET9 GCCCTGAGAG AGTTGCAGCA AGCGGTCCAC GCTGGTTTGC CCCAGCAGGC GAAAATCCTG TTTGATGGTG GTTAACGGCG GGATATAACA TGAGCTGTCT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3901                                                                                                4000
     pET9 TCGGTATCGT CGTATCCCAC TACCGAGATA TCCGCACCAA CGCGCAGCCC GGACTCGGTA ATGGCGCGCA TTGCGCCCAG CGCCATCTGA TCGTTGGCAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4001                                                                                                4100
     pET9 CCAGCATCGC AGTGGGAACG ATGCCCTCAT TCAGCATTTG CATGGTTTGT TGAAAACCGG ACATGGCACT CCAGTCGCCT TCCCGTTCCG CTATCGGCTG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4101                                                                                                4200
     pET9 AATTTGATTG CGAGTGAGAT ATTTATGCCA GCCAGCCAGA CGCAGACGCG CCGAGACAGA ACTTAATGGG CCCGCTAACA GCGCGATTTG CTGGTGACCC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4201                                                                                                4300
     pET9 AATGCGACCA GATGCTCCAC GCCCAGTCGC GTACCGTCTT CATGGGAGAA AATAATACTG TTGATGGGTG TCTGGTCAGA GACATCAAGA AATAACGCCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4301                                                                                                4400
     pET9 GAACATTAGT GCAGGCAGCT TCCACAGCAA TGGCATCCTG GTCATCCAGC GGATAGTTAA TGATCAGCCC ACTGACGCGT TGCGCGAGAA GATTGTGCAC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4401                                                                                                4500
     pET9 CGCCGCTTTA CAGGCTTCGA CGCCGCTTCG TTCTACCATC GACACCACCA CGCTGGCACC CAGTTGATCG GCGCGAGATT TAATCGCCGC GACAATTTGC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4501                                                                                                4600
     pET9 GACGGCGCGT GCAGGGCCAG ACTGGAGGTG GCAACGCCAA TCAGCAACGA CTGTTTGCCC GCCAGTTGTT GTGCCACGCG GTTGGGAATG TAATTCAGCT
      Seq
```

```
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4601                                                                                                 4700
     pET9  CCGCCATCGC CGCTTCCACT TTTTCCCGCG TTTTCGCAGA AACGTGGCTG GCCTGGTTCA CCACGCGGGA AACGGTCTGA TAAGAGACAC CGGCATACTC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4701                                                                                                 4800
     pET9  TGCGACATCG TATAACGTTA CTGGTTTCAC ATTCACCACC CTGAATTGAC TCTCTTCCGG GCGCTATCAT GCCATACCGC GAAAGGTTTT GCGCCATTCG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4801                                                                                                 4900
     pET9  ATGGTGTCCG GGATCTCGAC GCTCTCCCTT ATGCGACTCC TGCATTAGGA AGCAGCCCAG TAGTAGGTTG AGGCCGTTGA GCACCGCCGC CGCAAGGAAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4901                                                                                                 5000
     pET9  GGTGCATGCA AGGAGATGGC GCCCAACAGT CCCCCGGCCA CGGGGCCTGC CACCATACCC ACGCCGAAAC AAGCGCTCAT GAGCCCGAAG TGGCGAGCCC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5001                                                                                                 5100
     pET9  GATCTTCCCC ATCGGTGATG TCGGCGATAT AGGCGCCAGC AACCGCACCT GTGGCGCCGG TGATGCCGGC CACGATGCGT CCGGCGTAGA GGATCGAGAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5101                                                                                                 5200
     pET9  CTCGATCCCG CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTCC CCTCTAGAAA TAATTTTGTT TAACTTTAAG AAGGAGATAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5201                                                                                                 5300
     pET9  ACATATGTCT ATTGAAGTCA AAGTACCTGT TCTACCCGAG TCAGTAGCTG ATGCAACAGT GGCTGCGTGG CATAAGAAAG TGGGTGATAA AGTATCTCGC
      Seq      ATGTCT ATTGAAGTCA AAGTACCTGT TCTACCCGAG TCAGTAGCTG ATGCAACAGT GGCTGCGTGG CATAAGAAAG TGGGTGATAA AGTATCTCGC
Consensus  ....ATGTCT ATTGAAGTCA AAGTACCTGT TCTACCCGAG TCAGTAGCTG ATGCAACAGT GGCTGCGTGG CATAAGAAAG TGGGTGATAA AGTATCTCGC

           5301                                                                                                 5400
     pET9  GATGAGAACC TAGTTGATCT GGAAACAGAT AAAGTTGTGC TTGAAGTTCC ATCACCTGTG GATGGGGTAT TGTCTGACAT TCTGTTTAAT ACCGGAGATA
      Seq  GATGAGAACC TAGTTGATCT GGAAACAGAT AAAGTTGTGC TTGAAGTTCC ATCACCTGTG GATGGGGTAT TGTCTGACAT TCTGTTTAAT ACCGGAGATA
Consensus  GATGAGAACC TAGTTGATCT GGAAACAGAT AAAGTTGTGC TTGAAGTTCC ATCACCTGTG GATGGGGTAT TGTCTGACAT TCTGTTTAAT ACCGGAGATA

           5401                                                                                                 5500
     pET9  CGGTTGGTTC AGGAGACTTA CTGGCAAAAA TTTCTCAAAG TGTTTCTGTA GAATCTCAAA AAACTGAGAA AGAAGAGAAA CCTGTCAAAA AAGAAGAAAT
      Seq  CGGTTGGTTC AGGAGACTTA CTGGCAAAAA TTTCTCAAAG TGTTTCTGTA GAATCTCAAA AAACTGAGAA AGAAGAGAAA CCTGTCAAAA AAGAAGAAAT
Consensus  CGGTTGGTTC AGGAGACTTA CTGGCAAAAA TTTCTCAAAG TGTTTCTGTA GAATCTCAAA AAACTGAGAA AGAAGAGAAA CCTGTCAAAA AAGAAGAAAT

           5501                                                                                                 5600
     pET9  AAAAATTTCC GAAAGTGAAT CAGTTAGCAC AAAAGAAGAT AAATCAACCA GTCCGGTAGT AAGACGGATG ATGGCTGAAA ATGATTTGAA AGCCGGGCAG
      Seq  AAAAATTTCC GAAAGTGAAT CAGTTAGCAC AAAAGAAGAT AAATCAACCA GTCCGGTAGT AAGACGGATG ATGGCTGAAA ATGATTTGAA AGCCGGGCAG
Consensus  AAAAATTTCC GAAAGTGAAT CAGTTAGCAC AAAAGAAGAT AAATCAACCA GTCCGGTAGT AAGACGGATG ATGGCTGAAA ATGATTTGAA AGCCGGGCAG

           5601                                                                                                 5700
     pET9  ATTCAAGGTA CCGGTAAAGA TGGCAGGATA ACCAAAGAAG ATGTTTTATC TTACATAGAA TCCAATAGAG AAAAATCAAA CCAAACTGCT GAAGTCCAAA
      Seq  ATTCAAGGTA CCGGTAAAGA TGGCAGGATA ACCAAAGAAG ATGTTTTATC TTACATAGAA TCCAATAGAG AAAAATCAAA CCAAACTGCT GAAGTCCAAA
Consensus  ATTCAAGGTA CCGGTAAAGA TGGCAGGATA ACCAAAGAAG ATGTTTTATC TTACATAGAA TCCAATAGAG AAAAATCAAA CCAAACTGCT GAAGTCCAAA

           5701                                                                                                 5800
     pET9  AAGAATCTTC TATGAGAACA CTTTCTTTTG GTGGCAGGGA AGAAAAACGT GTCCCTATGA CGAGACTAAG AGCCAAGATT GCGGAACGTT TATTACAAGC
      Seq  AAGAATCTTC TATGAGAACA CTTTCTTTTG GTGGCAGGGA AGAAAAACGT GTCCCTATGA CGAGACTAAG AGCCAAGATT GCGGAACGTT TATTACAAGC
Consensus  AAGAATCTTC TATGAGAACA CTTTCTTTTG GTGGCAGGGA AGAAAAACGT GTCCCTATGA CGAGACTAAG AGCCAAGATT GCGGAACGTT TATTACAAGC

           5801                                                                                                 5900
     pET9  ACAGCACAAT GCTGCCATGT TAACCACTTT TAACGAAGTG AATTTAAAGG CAGTTATGGA TATGCGTTCT CAGTATAAAG ACAGCTTTGA AAAAAAACAT
      Seq  ACAGCACAAT GCTGCCATGT TAACCACTTT TAACGAAGTG AATTTAAAGG CAGTTATGGA TATGCGTTCT CAGTATAAAG ACAGCTTTGA AAAAAAACAT
Consensus  ACAGCACAAT GCTGCCATGT TAACCACTTT TAACGAAGTG AATTTAAAGG CAGTTATGGA TATGCGTTCT CAGTATAAAG ACAGCTTTGA AAAAAAACAT

           5901                                                                                                 6000
     pET9  GGTGTAAAAC TTGGATTTAT GTCTTTTTTT ACGAAGGCGG TAGTGGAGTC GCTTAAACGA TTTCCGGCTG TAAATGCTTC AATTGATGGC CAAGATATTG
      Seq  GGTGTAAAAC TTGGATTTAT GTCTTTTTTT ACGAAGGCGG TAGTGGAGTC GCTTAAACGA TTTCCGGCTG TAAATGCTTC AATTGATGGC CAAGATATTG
Consensus  GGTGTAAAAC TTGGATTTAT GTCTTTTTTT ACGAAGGCGG TAGTGGAGTC GCTTAAACGA TTTCCGGCTG TAAATGCTTC AATTGATGGC CAAGATATTG

           6001                                                                                                 6100
     pET9  TTTATCATGG CTTCTATGAT ATAGGAATTG CTGTTTCTAC TGAAAGAGGT TTAGTCGTTC CTGTGATTAG AGACGCTGAT CAGTTAAGTA TGGCAGAAAT
      Seq  TTTATCATGG CTTCTATGAT ATAGGAATTG CTGTTTCTAC TGAAAGAGGT TTAGTCGTTC CTGTGATTAG AGACGCTGAT CAGTTAAGTA TGGCAGAAAT
Consensus  TTTATCATGG CTTCTATGAT ATAGGAATTG CTGTTTCTAC TGAAAGAGGT TTAGTCGTTC CTGTGATTAG AGACGCTGAT CAGTTAAGTA TGGCAGAAAT

           6101                                                                                                 6200
     pET9  TGAATTAGCC ATTAATGACG CTGCATCAAA AGCCAGAACC GGAAAATTAT CTATGGAAGA GATGCAAGGG GGGACATTTA CCATAACTAA CGGTGGAGTC
      Seq  TGAATTAGCC ATTAATGACG CTGCATCAAA AGCCAGAACC GGAAAATTAT CTATGGAAGA GATGCAAGGG GGGACATTTA CCATAACTAA CGGTGGAGTC
Consensus  TGAATTAGCC ATTAATGACG CTGCATCAAA AGCCAGAACC GGAAAATTAT CTATGGAAGA GATGCAAGGG GGGACATTTA CCATAACTAA CGGTGGAGTC

           6201                                                                                                 6300
     pET9  TTCGGTTCAC TATTAGCTAC TCCCATTATC AACCCACCGC AAACTGGTAT TTTAGGGATG CATAAAATTG AGGAAAGACC TATTGTAGAG AAAGGGCAAA

      Seq  TTCGGTTCAC TATTAGCTAC TCCCATTATC AACCCACCGC AAACTGGTAT TTTAGGGATG CATAAAATTG AGGAAAGACC TATTGTAGAG AAAGGGCAAA
Consensus  TTCGGTTCAC TATTAGCTAC TCCCATTATC AACCCACCGC AAACTGGTAT TTTAGGGATG CATAAAATTG AGGAAAGACC TATTGTAGAG AAAGGGCAAA

           6301                                                                                                 6400
     pET9  TAGTAATCCG TCCTATGATG TATGTTGCTT TATCCTATGA TCATCGTTTA ATTGATGGAA AAGATTCTGT ACAATTTTTA GTGAGTGTTA AAGAGCTGTT
      Seq  TAGTAATCCG TCCTATGATG TATGTTGCTT TATCCTATGA TCATCGTTTA ATTGATGGAA AAGATTCTGT ACAATTTTTA GTGAGTGTTA AAGAGCTGTT
Consensus  TAGTAATCCG TCCTATGATG TATGTTGCTT TATCCTATGA TCATCGTTTA ATTGATGGAA AAGATTCTGT ACAATTTTTA GTGAGTGTTA AAGAGCTGTT

           6401                                                                                                 6500
     pET9  GGAAGATCCA TCCCGACTTT TACTGAATGT TCTCGAGCAC CACCACCACC ACCACTGAGA TCCGGCTGCT AACAAAGCCC GAAAGGAAGC TGAGTTGGCT
      Seq  GGAAGATCCA TCCCGACTTT TACTGAATGT T
Consensus  GGAAGATCCA TCCCGACTTT TACTGAATGT T.......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           6501                                                                                          6594
     pET9  GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA CCCCTTGGGG CCTCTAAACG GGTCTTGAGG GGTTTTTTGC TGAAAGGAGG AACTATATCC GGAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ....
```

pET22b(+)-lpg1974

```
          1                                                                                                   100
    pET10 TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          101                                                                                                 200
    pET10 CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCCCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          201                                                                                                 300
    pET10 GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          301                                                                                                 400
    pET10 CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACACTC AACCCTATCT CGGTCTATTC TTTTGATTTA TAAGGGATTT TGCCGATTTC GGCCTATTGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          401                                                                                                 500
    pET10 TTAAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAATTT AACGCGAATT TTAACAAAAT ATTAACGTTT ACAATTTCAG GTGGCACTTT TCGGGGAAAT GTGCGCGGAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          501                                                                                                 600
    pET10 CCCCTATTTG TTTATTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTTCAATAA TATTGAAAAA GGAAGAGTAT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          601                                                                                                 700
    pET10 GAGTATTCAA CATTTCCGTG TCGCCCTTAT TCCCTTTTTT GCGGCATTTT GCCTTCCTGT TTTTGCTCAC CCAGAAACGC TGGTGAAAGT AAAAGATGCT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          701                                                                                                 800
    pET10 GAAGATCAGT TGGGTGCACG AGTGGGTTAC ATCGAACTGG ATCTCAACAG CGGTAAGATC CTTGAGAGTT TTCGCCCCGA AGAACGTTTT CCAATGATGA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          801                                                                                                 900
    pET10 GCACTTTTAA AGTTCTGCTA TGTGGCGCGG TATTATCCCG TATTGACGCC GGGCAAGAGC AACTCGGTCG CCGCATACAC TATTCTCAGA ATGACTTGGT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          901                                                                                                1000
    pET10 TGAGTACTCA CCAGTCACAG AAAAGCATCT TACGGATGGC ATGACAGTAA GAGAATTATG CAGTGCTGCC ATAACCATGA GTGATAACAC TGCGGCCAAC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1001                                                                                               1100
    pET10 TTACTTCTGA CAACGATCGG AGGACCGAAG GAGCTAACCG CTTTTTTGCA CAACATGGGG GATCATGTAA CTCGCCTTGA TCGTTGGGAA CCGGAGCTGA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1101                                                                                               1200
    pET10 ATGAAGCCAT ACCAAACGAC GAGCGTGACA CCACGATGCC TGCAGCAATG GCAACAACGT TGCGCAAACT ATTAACTGGC GAACTACTTA CTCTAGCTTC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........
```

```
          1201                                                                                                1300
    pET10 CCGGCAACAA TTAATAGACT GGATGGAGGC GGATAAAGTT GCAGGACCAC TTCTGCGCTC GGCCCTTCCG GCTGGCTGGT TTATTGCTGA TAAATCTGGA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1301                                                                                                1400
    pET10 GCCGGTGAGC GTGGGTCTCG CGGTATCATT GCAGCACTGG GGCCAGATGG TAAGCCCTCC CGTATCGTAG TTATCTACAC GACGGGGAGT CAGGCAACTA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1401                                                                                                1500
    pET10 TGGATGAACG AAATAGACAG ATCGCTGAGA TAGGTGCCTC ACTGATTAAG CATTGGTAAC TGTCAGACCA AGTTTACTCA TATATACTTT AGATTGATTT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1501                                                                                                1600
    pET10 AAAACTTCAT TTTTAATTTA AAAGGATCTA GGTGAAGATC CTTTTTGATA ATCTCATGAC CAAAATCCCT TAACGTGAGT TTTCGTTCCA CTGAGCGTCA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1601                                                                                                1700
    pET10 GACCCCGTAG AAAAGATCAA AGGATCTTCT TGAGATCCTT TTTTTCTGCG CGTAATCTGC TGCTTGCAAA CAAAAAAACC ACCGCTACCA GCGGTGGTTT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1701                                                                                                1800
    pET10 GTTTGCCGGA TCAAGAGCTA CCAACTCTTT TTCCGAAGGT AACTGGCTTC AGCAGAGCGC AGATACCAAA TACTGTCCTT CTAGTGTAGC CGTAGTTAGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1801                                                                                                1900
    pET10 CCACCACTTC AAGAACTCTG TAGCACCGCC TACATACCTC GCTCTGCTAA TCCTGTTACC AGTGGCTGCT GCCAGTGGCG ATAAGTCGTG TCTTACCGGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          1901                                                                                                2000
    pET10 TTGGACTCAA GACGATAGTT ACCGGATAAG GCGCAGCGGT CGGGCTGAAC GGGGGGTTCG TGCACACAGC CCAGCTTGGA GCGAACGACC TACACCGAAC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2001                                                                                                2100
    pET10 TGAGATACCT ACAGCGTGAG CTATGAGAAA GCGCCACGCT TCCCGAAGGG AGAAAGGCGG ACAGGTATCC GGTAAGCGGC AGGGTCGGAA CAGGAGAGCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2101                                                                                                2200
    pET10 CACGAGGGAG CTTCCAGGGG GAAACGCCTG GTATCTTTAT AGTCCTGTCG GGTTTCGCCA CCTCTGACTT GAGCGTCGAT TTTTGTGATG CTCGTCAGGG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2201                                                                                                2300
    pET10 GGGCGGAGCC TATGGAAAAA CGCCAGCAAC GCGGCCTTTT TACGGTTCCT GGCCTTTTGC TGGCCTTTTG CTCACATGTT CTTTCCTGCG TTATCCCCTG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2301                                                                                                2400
    pET10 ATTCTGTGGA TAACCGTATT ACCGCCTTTG AGTGAGCTGA TACCGCTCGC CGCAGCCGAA CGACCGAGCG CAGCGAGTCA GTGAGCGAGG AAGCGGAAGA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2401                                                                                                2500
    pET10 GCGCCTGATG CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTCACACC GCATATATGG TGCACTCTCA GTACAATCTG CTCTGATGCC GCATAGTTAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2501                                                                                                2600
    pET10 GCCAGTATAC ACTCCGCTAT CGCTACGTGA CTGGGTCATG GCTGCGCCCC GACACCCGCC AACACCCGCT GACGCGCCCT GACGGGCTTG TCTGCTCCCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2601                                                                                                2700
    pET10 GCATCCGCTT ACAGACAAGC TGTGACCGTC TCCGGGAGCT GCATGTGTCA GAGGTTTTCA CCGTCATCAC CGAAACGCGC GAGGCAGCTG CGGTAAAGCT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2701                                                                                                2800
    pET10 CATCAGCGTG GTCGTGAAGC GATTCACAGA TGTCTGCCTG TTCATCCGCG TCCAGCTCGT TGAGTTTCTC CAGAAGCGTT AATGTCTGGC TTCTGATAAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          2801                                                                                                2900
    pET10 GCGGGCCATG TTAAGGGCGG TTTTTTCCTG TTTGGTCACT GATGCCTCCG TGTAAGGGGG ATTTCTGTTC ATGGGGGTAA TGATACCGAT GAAACGAGAG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........
```

```
          2901                                                                                                3000
    pET10 AGGATGCTCA CGATACGGGT TACTGATGAT GAACATGCCC GGTTACTGGA ACGTTGTGAG GGTAAACAAC TGGCGGTATG GATGCGGCGG GACCAGAGAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3001                                                                                                3100
    pET10 AAATCACTCA GGGTCAATGC CAGCGCTTCG TTAATACAGA TGTAGGTGTT CCACAGGGTA GCCAGCAGCA TCCTGCGATG CAGATCCGGA ACATAATGGT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3101                                                                                                3200
    pET10 GCAGGGCGCT GACTTCCGCG TTTCCAGACT TTACGAAACA CGGAAACCGA AGACCATTCA TGTTGTTGCT CAGGTCGCAG ACGTTTTGCA GCAGCAGTCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3201                                                                                                3300
    pET10 CTTCACGTTC GCTCGCGTAT CGGTGATTCA TTCTGCTAAC CAGTAAGGCA ACCCCGCCAG CCTAGCCGGG TCCTCAACGA CAGGAGCACG ATCATGCGCA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3301                                                                                                3400
    pET10 CCCGTGGGGC CGCCATGCCG GCGATAATGG CCTGCTTCTC GCCGAAACGT TTGGTGGCGG GACCAGTGAC GAAGGCTTGA GCGAGGGCGT GCAAGATTCC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3401                                                                                                3500
    pET10 GAATACCGCA AGCGACAGGC CGATCATCGT CGCGCTCCAG CGAAAGCGGT CCTCGCCGAA AATGACCCAG AGCGCTGCCG GCACCTGTCC TACGAGTTGC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3501                                                                                                3600
    pET10 ATGATAAAGA AGACAGTCAT AAGTGCGGCG ACGATAGTCA TGCCCCGCGC CCACCGGAAG GAGCTGACTG GGTTGAAGGC TCTCAAGGGC ATCGGTCGAG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3601                                                                                                3700
    pET10 ATCCCGGTGC CTAATGAGTG AGCTAACTTA CATTAATTGC GTTGCGCTCA CTGCCCGCTT TCCAGTCGGG AAACCTGTCG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3701                                                                                                3800
    pET10 CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG TATTGGGCGC CAGGGTGGTT TTTCTTTTCA CCAGTGAGAC GGGCAACAGC TGATTGCCCT TCACCGCCTG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3801                                                                                                3900
    pET10 GCCCTGAGAG AGTTGCAGCA AGCGGTCCAC GCTGGTTTGC CCCAGCAGGC GAAAATCCTG TTTGATGGTG GTTAACGGCG GGATATAACA TGAGCTGTCT
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          3901                                                                                                4000
    pET10 TCGGTATCGT CGTATCCCAC TACCGAGATA TCCGCACCAA CGCGCAGCCC GGACTCGGTA ATGGCGCGCA TTGCGCCCAG CGCCATCTGA TCGTTGGCAA
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4001                                                                                                4100
    pET10 CCAGCATCGC AGTGGGAACG ATGCCCTCAT TCAGCATTTG CATGGTTTGT TGAAAACCGG ACATGGCACT CCAGTCGCCT TCCCGTTCCG CTATCGGCTG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4101                                                                                                4200
    pET10 AATTTGATTG CGAGTGAGAT ATTTATGCCA GCCAGCCAGA CGCAGACGCG CCGAGACAGA ACTTAATGGG CCCGCTAACA GCGCGATTTG CTGGTGACCC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4201                                                                                                4300
    pET10 AATGCGACCA GATGCTCCAC GCCCAGTCGC GTACCGTCTT CATGGGAGAA AATAATACTG TTGATGGGTG TCTGGTCAGA GACATCAAGA AATAACGCCG
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4301                                                                                                4400
    pET10 GAACATTAGT GCAGGCAGCT TCCACAGCAA TGGCATCCTG GTCATCCAGC GGATAGTTAA TGATCAGCCC ACTGACGCGT TGCGCGAGAA GATTGTGCAC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4401                                                                                                4500
    pET10 CGCCGCTTTA CAGGCTTCGA CGCCGCTTCG TTCTACCATC GACACCACCA CGCTGGCACC CAGTTGATCG GCGCGAGATT TAATCGCCGC GACAATTTGC
      Seq
Consensus ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........

          4501                                                                                                4600
    pET10 GACGGCGCGT GCAGGGCCAG ACTGGAGGTG GCAACGCCAA TCAGCAACGA CTGTTTGCCC GCCAGTTGTT GTGCCACGCG GTTGGGAATG TAATTCAGCT
      Seq
```

```
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4601                                                                                                 4700
    pET10  CCGCCATCGC CGCTTCCACT TTTTCCCGCG TTTTCGCAGA AACGTGGCTG GCCTGGTTCA CCACGCGGGA AACGGTCTGA TAAGAGACAC CGGCATACTC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4701                                                                                                 4800
    pET10  TGCGACATCG TATAACGTTA CTGGTTTCAC ATTCACCACC CTGAATTGAC TCTCTTCCGG GCGCTATCAT GCCATACCGC GAAAGGTTTT GCGCCATTCG
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4801                                                                                                 4900
    pET10  ATGGTGTCCG GGATCTCGAC GCTCTCCCTT ATGCGACTCC TGCATTAGGA AGCAGCCCAG TAGTAGGTTG AGGCCGTTGA GCACCGCCGC CGCAAGGAAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           4901                                                                                                 5000
    pET10  GGTGCATGCA AGGAGATGGC GCCCAACAGT CCCCCGGCCA CGGGGCCTGC CACCATACCC ACGCCGAAAC AAGCGCTCAT GAGCCCGAAG TGGCGAGCCC
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5001                                                                                                 5100
    pET10  GATCTTCCCC ATCGGTGATG TCGGCGATAT AGGCGCCAGC AACCGCACCT GTGGCGCCGG TGATGCCGGC CACGATGCGT CCGGCGTAGA GGATCGAGAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5101                                                                                                 5200
    pET10  CTCGATCCCG CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTCC CCTCTAGAAA TAATTTTGTT TAACTTTAAG AAGGAGATAT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           5201                                                                                                 5300
    pET10  ACATATGTTT AGTTTGAAAA AAACAACTGC GGCTGTACTT GCTCTAGGAA GCAGTGCTTT GTTTGCCGGT ACGATGGGAC CAGTATGTAC TCCAGGCAAC
      Seq      ATGTTT AGTTTGAAAA AAACAACTGC GGCTGTACTT GCTCTAGGAA GCAGTGCTTT GTTTGCCGGT ACGATGGGAC CAGTATGTAC TCCAGGCAAC
Consensus  ....ATGTTT AGTTTGAAAA AAACAACTGC GGCTGTACTT GCTCTAGGAA GCAGTGCTTT GTTTGCCGGT ACGATGGGAC CAGTATGTAC TCCAGGCAAC

           5301                                                                                                 5400
    pET10  GTAACTGTTC CTTGCGAGAG AACAGCATGG GATGTTGGTA TTACCGCGCT CTATCTGCAG CCAGTGTATG ATGCTGATTG GGGCTATAAT GGTTTTACTG
      Seq  GTAACTGTTC CTTGCGAGAG AACAGCATGG GATGTTGGTA TTACCGCGCT CTATCTGCAG CCAGTGTATG ATGCTGATTG GGGCTATAAT GGTTTTACTG
Consensus  GTAACTGTTC CTTGCGAGAG AACAGCATGG GATGTTGGTA TTACCGCGCT CTATCTGCAG CCAGTGTATG ATGCTGATTG GGGCTATAAT GGTTTTACTG

           5401                                                                                                 5500
    pET10  ATGTTGGTGG CTGGAGAAAT TGGCATGACG TTGATTTAGA GTGGGATTGG GGCTTTAAAC TAGAAGGCTC TTATCACTTC AACACAGGCA ACGACATCAA
      Seq  ATGTTGGTGG CTGGAGAAAT TGGCATGACG TTGATTTAGA GTGGGATTGG GGCTTTAAAC TAGAAGGCTC TTATCACTTC AACACAGGCA ACGACATCAA
Consensus  ATGTTGGTGG CTGGAGAAAT TGGCATGACG TTGATTTAGA GTGGGATTGG GGCTTTAAAC TAGAAGGCTC TTATCACTTC AACACAGGCA ACGACATCAA

           5501                                                                                                 5600
    pET10  TGTCAATTGG TACCATTTGG ATGCCGAACC CGATCATTGG GCGTTTGTTG ATCAATTGCA CGCCTACGAC ATTACCTGGG ATGCTGTGAA TGCTGAACTG
      Seq  TGTCAATTGG TACCATTTGG ATGCCGACAC CGATCATTGG GCGTTTGTTG ATCAATTGCA CGCCTACGAC ATTACCTGGG ATGCTGTGAA TGCTGAACTG
Consensus  TGTCAATTGG TACCATTTGG ATGCCGAaaC CGATCATTGG GCGTTTGTTG ATCAATTGCA CGCCTACGAC ATTACCTGGG ATGCTGTGAA TGCTGAACTG

           5601                                                                                                 5700
    pET10  GGGCAATTTG TCGATTTTAG CGCGAACAAA AAAATGCGCT TCCATGGTGG CGTTCAGTAT GCCTACATCA AAACAGACGT TAATCGTCAT TTAAACGGCT
      Seq  GGGCAATTTG TCGATTTTAG CGCGAACAAA AAAATGCGCT TCCATGGTGG CGTTCAGTAT GCCTACATCA AAACAGACGT TAATCGTCAT TTAAACGGCT
Consensus  GGGCAATTTG TCGATTTTAG CGCGAACAAA AAAATGCGCT TCCATGGTGG CGTTCAGTAT GCCTACATCA AAACAGACGT TAATCGTCAT TTAAACGGCT

           5701                                                                                                 5800
    pET10  TCTTTTTAGA TAACTTCAAT TCCAAATTCA ATGGATTTGG TCCCCGTACT GGCCTTGATA TGAATTATGT ATTTGGTAAC GGGTTCGGAG TTTATGCGAA
      Seq  TCTTTTTAGA TAACTTCAAT TCCAAATTCA ATGGATTTGG TCCCCGTACT GGCCTTGATA TGAATTATGT ATTTGGTAAC GGGTTCGGAG TTTATGCGAA
Consensus  TCTTTTTAGA TAACTTCAAT TCCAAATTCA ATGGATTTGG TCCCCGTACT GGCCTTGATA TGAATTATGT ATTTGGTAAC GGGTTCGGAG TTTATGCGAA

           5801                                                                                                 5900
    pET10  ATCAGCTGTT GCTATCTTGG TTGGTACAAG TAAGTTCCTC GATAACTGCA CTGTCTGTGG ATATTCTTAT GGTTCCAAAA ATGCAATTGT GCCAGAAGTT
      Seq  ATCAGCTGTT GCTATCTTGG TTGGTACAAG TAAGTTCCTC GATAACTGCA CTGTCTGTGG ATATTCTTAT GGTTCCAAAA ATGCAATTGT GCCAGAAGTT
Consensus  ATCAGCTGTT GCTATCTTGG TTGGTACAAG TAAGTTCCTC GATAACTGCA CTGTCTGTGG ATATTCTTAT GGTTCCAAAA ATGCAATTGT GCCAGAAGTT

           5901                                                                                                 6000
    pET10  GAAATGAAGC TGGGAGCAGA TTATACCTAT GCAATGGCCC AAGGCGATTT GACTCTGGAC GTTGGTTACA TGTGGTTTAA TTACTTCAAC GCACTGCATA
      Seq  GAAATGAAGC TGGGAGCAGA TTATACCTAT GCAATGGCCC AAGGCGATTT GACTCTGGAC GTTGGTTACA TGTGGTTTAA TTACTTCAAC GCACTGCATA
Consensus  GAAATGAAGC TGGGAGCAGA TTATACCTAT GCAATGGCCC AAGGCGATTT GACTCTGGAC GTTGGTTACA TGTGGTTTAA TTACTTCAAC GCACTGCATA

           6001                                                                                                 6100
    pET10  ATACTGCTGC CGTGAATGTT GGATTAGGAG CTTCATTGGA AACAGACTTC TCTGCATCTG GCCCCTACAT AGGCTTAAAA TACGTTGGCA ATGTCCTCGA
      Seq  ATACTGCTGC CGTGAATGTT GGATTAGGAG CTTCATTGGA AACAGACTTC TCTGCATCTG GCCCCTACAT AGGCTTAAAA TACGTTGGCA ATGTC
Consensus  ATACTGCTGC CGTGAATGTT GGATTAGGAG CTTCATTGGA AACAGACTTC TCTGCATCTG GCCCCTACAT AGGCTTAAAA TACGTTGGCA ATGTC.....

           6101                                                                                                 6200
    pET10  GCACCACCAC CACCACCACT GAGATCCGGC TGCTAACAAA GCCCGAAAGG AAGCTGAGTT GGCTGCTGCC ACCGCTGAGC AATAACTAGC ATAACCCCTT
      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........

           6201                                                6258
    pET10  GGGGCCTCTA AACGGGTCTT GAGGGGTTTT TTGCTGAAAG GAGGAACTAT ATCCGGAT


      Seq
Consensus  .......... .......... .......... .......... .......... ........
```