



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**„Verbreitung und Rekombination von Genen zur Synthese
von Toxinen und Peptiden in Cyanobakterien“**

Verfasser

Mark Frei

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 441

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Genetik - Mikrobiologie

Betreuerin :

ao. Univ.-Prof. Dipl.-Biol. Dr. Angela Witte

Zusammenfassung

Verbreitung und Rekombination von Genen zur Synthese von Toxinen und Peptiden in Cyanobakterien

Mark Frei, Forschungsinstitut für Limnologie (Mondsee), Universität Innsbruck, Diplomarbeit

Die planktisch lebenden Cyanobakterien sind durch die Produktion von Toxinen in Binnengewässern bekannt. Es ist daher wichtig die Vererbung und Verbreitung der genetischen Basis zur Synthese dieser Toxine zu erforschen. Die filamentösen Cyanobakterien der Gattung *Planktothrix* kommen weltweit in Binnengewässern vor und produzieren neben dem bekannten toxischen Heptapeptid Microcystin auch noch zahlreiche bioaktive Peptide. Aufgrund der Fähigkeit von *Planktothrix* Algenblüten zu bilden, können gesundheitsgefährdende Konzentrationen dieser Toxine, z.B. Microcystine auftreten. Neben den Microcystinen werden die bioaktiven Peptide Aeruginosin, Anabaenopeptin, Cyanopeptolin, Microginin, Microviridin und Planktocyclin produziert. Diese Peptide fungieren zum Teil als Protease Inhibitor und tragen z.B. zum Fraßschutz bei. Das Toxin Microcystin und die Peptide Aeruginosin, Anabaenopeptin, Cyanopeptolin und Microginin werden nach dem Prinzip des Multienzyme Thiotemplate Mechanismus der nicht-ribosomalen Peptidsynthese (wie z.B. die klassischen Peptidantibiotika) synthetisiert. Die anderen Peptide (Microviridin und Planktocyclin) werden jedoch ribosomal durch posttranslationale Modifikationen der Prä-Peptide, welche in Precursorgene kodiert sind realisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 142 Isolate von *Planktothrix*, die von verschiedenen Klimazonen stammen auf ihre genetische Basis zur Produktion dieser Peptide untersucht. Hierfür wurden alle Isolate mittels PCR mit spezifischen Primern auf das Vorhandensein der einzelnen Peptidgencluster untersucht. Einige Peptidgencluster, die nicht nachgewiesen werden konnten, wurden einer erneuten Suche nach Resten dieser Peptidgencluster unterzogen.

Weiters wurde die genetische Variation innerhalb des Genclusters des ribosomal synthetisierten Peptids Microviridin untersucht. Dabei wurde neben dem Vorhandensein von akzessorischen Enzymen, auch die Variabilität der Precursorgene überprüft.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass man generell bei Isolaten der gemäßigten Breiten wie *P. agardhii* und *P. rubescens* sechs verschiedene Peptidgencluster (Aeruginosin, Anabaenopeptin, Cyanopeptolin, Microginin, Microcystin, Microviridin und Planktocyclin) findet. Im schon sequenzierten Genom von *P. agardhii* sind drei Peptidgencluster (Anabaenopeptin, Cyanopeptolin und Microviridin) direkt benachbart. Dieser Multi-peptidgencluster konnte auch bei der überwiegenden Mehrheit der 142 Isolate von *Planktothrix* nachgewiesen werden.

Es war auffällig, dass eine größere Anzahl der Isolate den Microcystingencluster verloren haben und nur noch Genreste aufwiesen. Im Gegensatz dazu wurde der Verlust des Anabaenopeptin- und

Cyanopeptolingenclusters nur bei einigen Isolaten festgestellt. In einzelnen Fällen könnte dieser Verlust auch die Auflösung des Multipeptidgenclusters bedeuten. Der Gencluster für das Peptid Microginin wurde nur in einzelnen Isolaten nachgewiesen.

Überraschenderweise wurde bei den Isolaten aus der tropischen Klimazone von der Gattung *P. pseudagardhii* keine dieser bekannten Gencluster gefunden. Es konnten lediglich Fragmente der Cyanopeptolin- und Microcystingencluster identifiziert werden.

Da die beobachtete Variabilität der gefundenen Gencluster durch Verlustprozesse zustande gekommen ist, muss man daraus schließen, dass bei der Vererbung der Gencluster der horizontale Transfer innerhalb der Gattung *Planktothrix* keine Rolle spielt. Einzig die geringe Abundanz des Microginin Genclusters könnte durch horizontalen Gentransfer verursacht sein.

Innerhalb der *Planktothrix* Isolate unterschied sich die Microviridinsynthese vor allem im Vorhandensein der Acetyltransferase (ACT) und der Anzahl der Precursorgene. Das Vorhandensein der ACT geht wahrscheinlich auf ein Rekombinationsereignis zurück, da bei den Isolaten ohne ACT kein Hinweis für einen Genabbau festgestellt wurde.

Es wurden Isolate mit einem, zwei oder drei Precursorgenen festgestellt. Die Mehrheit der Isolate (2/3) wiesen nur ein Precursorgen auf, wobei sich innerhalb dieser Isolate die Variabilität auf nur zwei Prä-Peptid (Corepeptid) Varianten beschränkt. Eine kleinere Anzahl an Isolaten, die zwei oder drei Precursorgene hatten, zeigten mit 17 verschiedenen Corepeptid Varianten eine viel höhere Variabilität. Bei einigen Isolaten wurde innerhalb des Microviridingenclusters noch kurze Insertionen in der „intergenic spacer“ (IGS) Region, ein hypothetisches Protein mit einer möglichen Funktion zur Plasmidstabilisierung und Reste eines Precursors gefunden. Diese hohe genetische Variation innerhalb der Precursorpeptide kam wahrscheinlich ebenfalls durch zahlreiche regelmäßige Rekombinationsereignisse zustande, was letztendlich auch in einer hohen Anzahl an Microviridin Strukturvarianten resultieren sollte.

Da die Microviridine ribosomal synthetisiert werden ist auch eine genaue Vorhersage der Masse anhand der Sequenz der Corepeptide möglich. Unter Zuhilfenahme von massenspektrometrischen Verfahren konnte gezeigt werden, dass einzelne Isolate mit einem zweiten Precursorgen auch eine weitere Microviridin Strukturvariante produzieren.

Danksagung

Viele Personen haben mich beim Entstehen dieser Diplomarbeit unterstützt. All diesen Menschen gebührt mein herzlicher Dank. Insbesondere hervorheben möchte ich an dieser Stelle meine Betreuer Dr. Rainer Kurmayer (Forschungsinstitut für Limnologie, Mondsee) als Mastermind meiner Diplomarbeit, der zu jeder Tages- und Nachtzeit ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte und Univ.-Prof. Dipl.-Biol. Dr. Angela Witte (Universität Wien).

Dr. Guntram Christiansen danke ich für die Hilfestellung und nützlichen Tipps bei der praktischen Tätigkeit im Labor sowie für die Verbreitung positiver Stimmung, die mich zu Höchstleistungen angetrieben hat.

Weiters anführen möchte ich die technischen Assistentinnen Anneliese Wiedlroither und Katharina Moosbrugger, ohne die der tägliche Arbeitsbetrieb nicht möglich gewesen wäre.

Danken möchte ich auch Sabine Ullrich und Qin Chen für die unermüdliche Hilfe bei diversen Arbeiten im Labor.

Die LC/MS Messungen für die Microviridine wurden freundlicherweise von Dr. Judith Blom (Limnologische Station, Universität Zürich) durchgeführt.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie und Dr. Astrid Raufer für die moralische und finanzielle Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit.

Diese Diplomarbeit wurde durch das FWF-Projekt P24070 „Mobilomik der Toxinproduktion bei Cyanobakterien“ finanziert.

Abkürzungsverzeichnis

A-Domäne	Adenylierungsdomäne
AB	Antibiotika
<i>aer</i>	Gencluster der Aeruginosinsynthetase
Amp	Ampicillin
<i>apn</i>	Gencluster der Anabaenopeptinsynthetase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CCAP	Culture Collection of Algae and Protozoa (Großbritannien)
Chl a	Chlorophyll a
Cm	Chloramphenicol
<i>oci</i>	Gencluster der Cyanopeptolinsynthetase
NIVA-CYA	Norwegian Institute for Water Research, Cyanobacteria Culture Collection
Dhb	Dehydrobutyrat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Direct Repeat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HR	homologe Rekombination
g	Erdbeschleunigung
IR	Inverted Repeat
IGS	Intergenic Spacer
IS-Element	Insertionselement
ITS	Internal Transcribed Spacer
kb	Kilobasenpaar
M	Mol
MC	Microcystin
<i>mcy</i>	Gencluster der Microcystinsynthetase
Mdha	N-Methyldehydroalanin
<i>mic</i>	Gencluster der Microgininsynthetase
MilliQ	Millipore Wasser
min	Minuten
MLST	Multi Locus Sequence Typing
<i>mvd</i>	Microviridin Gencluster
NIES	National Institute for Environmental Studies (Japan), Culture Collection
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
<i>pag</i>	Planktocyclin Gencluster
PC	Precursor
PCC	Pasteur Culture Collection (Frankreich)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PK	Proteinkinase
PP	Proteinphosphatase
PKS	Polyketid-Synthase
PTM	Posttranslationale Modifikationen
RE	Restriktionsendonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPS	Ribosomale Peptidsynthese

SAG	Culture Collection of Algae (Deutschland)
sec	Sekunden
UV	ultraviolette Strahlung
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen in Volumen
w/v	Gewicht in Volumen
V.linie	Verwandtschaftslinie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Cyanobakterien	1
1.2 Cyanobakterienblüten	2
1.3 Die untersuchten Cyanobakterien	2
1.3.1 <i>Planktothrix</i> spp.....	2
1.3.2 <i>Oscillatoria</i> spp.	3
1.3.3 <i>Geitlerinema</i> spp	4
1.4 Sekundärmetaboliten	4
1.4.1 Cyanotoxine	4
1.4.2 Nicht toxische (bioaktive) Verbindungen	6
1.5 Biosynthesewege.....	10
1.5.1 Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen und Polyketidsynthasen	11
1.5.2 Ribosomale Peptidsynthese	12
1.6 Aufbau der einzelnen Gencluster	13
1.7 Horizontaler Gentransfer oder Verlust Theorie der Peptidgencluster	16
1.7.1 Insertionselemente (IS-Element).....	17
1.8 Funktionelle Rekombinationen im <i>mcy</i> Gencluster	18
1.9 Ziele dieser Arbeit	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien	20
2.1.2 Enzyme	21
2.1.3 Nukleinsäuren	21
2.1.4 Marker	26
2.1.5 Kits	26
2.1.6 Geräte	26
2.1.7 Medien	27
2.1.8 Lösungen und Puffer	27
2.1.9 Software	29
2.1.10 Biologisches Material	29
2.2 Methoden.....	34
2.2.1 Kultivierung der Cyanobakterienisolate	34
2.2.2 Isolation von Nukleinsäuren.....	34
2.2.3 PCR Protokolle und Master Mixe	35
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.5 Herstellung von λ /PstI Marker	37

2.2.6 Klonierung	37
2.2.7 Ligation & Transformation	37
2.2.8 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	38
2.2.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	38
2.2.10 Mutagenese.....	38
2.2.11 Genome Walking	41
3 Ergebnisse.....	45
3.1 Präsenz und Absenz der Peptid(synthetase) – Gencluster.....	45
3.1.1 Gencluster der Aeruginosinsynthetase (<i>aer</i>)	45
3.1.2 Gencluster der Anabaenopeptinsynthetase (<i>apn</i>)	45
3.1.3 Gencluster der Cyanopeptolinsynthetase (<i>oci</i>)	45
3.1.4 Gencluster der Microgininsynthetase (<i>mic</i>)	46
3.1.5 Gencluster der Microcystinsynthetase (<i>mcy</i>).....	46
3.1.6 Microviridin Gencluster (<i>mvd</i>).....	46
3.1.7 Planktocyclin Gencluster (<i>pag</i>).....	47
3.2 Verlust von NRPS	50
3.2.1 Microcystin	50
3.2.2 Anabaenopeptin	52
3.2.3 Cyanopeptolin	52
3.3 Suche nach Genresten in NRPS mittels der Genome Walking Methode	53
3.3.1 Anabaenopeptin	53
3.3.2 Cyanopeptolin	54
3.4 Anordnung dreier Peptid(synthetase)gencluster im Genom (Multipeptidgencluster).....	55
3.5 Funktionelle Rekombinationen des ribosomalen Peptids Microviridin	59
3.5.1 Vorhandensein oder Fehlen der Acetyltransferase	59
3.5.2 Precursorpeptidgene.....	62
3.5.3 Corepeptid Genotypen	65
3.5.4 Leaderpeptid Genotypen	67
3.5.5 Detektion von Rekombinationen im Bereich der Precursorpeptid Genotypen	69
3.6 Mutagenese.....	73
4 Diskussion	74
4.1 Verbreitung der verschiedenen Peptidgencluster	74
4.2 Verlust von Peptidgenclustern	74
4.3 Lokalisation und Funktion des Multipeptidgencluster	75
4.4 Funktionelle Rekombinationen im Microviridin Gencluster	76
5 Literatur	79
Anhang A <i>oci</i> B Sequenzen	82
Anhang B <i>mcy</i> T Sequenzen	83
Anhang C Genome Walking Sequenzen	86

Anhang D IS-Element der IGS Region von <i>apn/oci</i>	88
Anhang E <i>mvdB</i> IGS Region Sequenzen	91
Anhang F <i>mvd</i> Precursor Sequenzen	92

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1 Allgemeine Microcystin Struktur	5
Abb. 2 Allgemeine Aeruginosin Struktur	6
Abb. 3 Allgemeine Anabaenopeptin Struktur	7
Abb. 4 Allgemeine Cyanopeptolin Struktur	8
Abb. 5 Allgemeine Microginin Struktur	9
Abb. 6 Allgemeine Microviridin Struktur	9
Abb. 7 Allgemeine Planktocyclin Struktur	10
Abb. 8 Schematischer Aufbau einer NRPS und PKS	11
Abb. 9 Schematischer Aufbau eines RPS Genclusters	12
Abb. 10 Schematischer Aufbau des Microcystinsynthetase-Genclusters in <i>Planktothrix</i>	13
Abb. 11 Schematischer Aufbau der Aeruginosinsynthetase-Genclusters in <i>Planktothrix</i>	13
Abb. 12 Schematischer Aufbau des Anabaenopeptinsynthetase-Genclusters in <i>Planktothrix</i>	14
Abb. 13 Schematischer Aufbau des Cyanopeptolinsynthetase-Genclusters in <i>Planktothrix</i>	14
Abb. 14 Schematischer Aufbau des Microgininsynthetase-Genclusters in <i>Planktothrix</i>	15
Abb. 15 Schematischer Aufbau des Microviridin-Genclusters in <i>Planktothrix</i>	15
Abb. 16 Schematischer Aufbau des Planktocyclin-Genclusters in <i>Planktothrix</i>	16
Abb. 17 Schematische Darstellung eines IS-Elementes	17
Abb. 18 Darstellung der <i>mcy</i> Mutationen in <i>Planktothrix</i>	18
Abb. 19 Konstrukt Herstellung und homologe Rekombination	39
Abb. 20 Struktur des Adaptors und der Adaptor Primer	41
Abb. 21 Überblick der Schritte des Genome Walking	43
Abb. 22 Der „suppression PCR“ Effekt	44
Abb. 23 Gelbilder zur Präsenz oder Absenz der PCR Produkte der untersuchten Peptidgencluster	47
Abb. 24 <i>ociB</i> (Ahp) Sequenzalignment	50
Abb. 25 Sequenzalignment der 5' flankierenden Region von <i>mcyT</i> und <i>mcyT</i> Rest	51

Abb. 26 Amplifikation der einzelnen aneinandergrenzenden Genregionen des kompletten Microcystingencluster	52
Abb. 27 Versuch der Amplifikation der einzelnen Genregionen des Cyanopeptolingenclusters für den Stamm 758.....	53
Abb. 28 Überblick der gefundenen <i>apn</i> Gencluster Reste bei Isolaten.....	54
Abb. 29 Multipeptidgencluster Überblick.....	55
Abb. 30 Überbrückungs PCR Ergebnisse zur Überprüfung der benachbarten Anordnung des <i>mvd</i> und <i>apn</i> Genclusters im Genom	55
Abb. 31 Überbrückungs PCR Ergebnisse zur Überprüfung der benachbarten Anordnung des <i>apn</i> und <i>oci</i> Genclusters im Genom	56
Abb. 32 Multipeptidgencluster mit mobilen Element (IS) in der IGS Region.....	56
Abb. 33 Größen Polymorphismus zwischen <i>apn</i> und <i>oci</i> Gencluster	57
Abb. 34 IS-Element Sequenzvergleich.....	57
Abb. 35 Gesamtüberblick der Überbrückungs PCR Ergebnisse	58
Abb. 36 Überprüfung des <i>mvd</i> Genclusters auf Größenpolymorphismen.....	59
Abb. 37 Alignment der IGS Region von <i>mvdA/C</i>	61
Abb. 38 Größenpolymorphismen bei der Amplifikation der Precursorgene.....	62
Abb. 39 Verteilung der <i>mvd</i> Typen auf die Verwandtschaftslinien	63
Abb. 40 Verteilung aller <i>mvd</i> Precursor Varianten auf die Verwandtschaftslinien	66
Abb. 41 Verteilung der Leaderpeptid Varianten auf die Verwandtschaftslinien	68
Abb. 42 Alignment der IGS Region von <i>mvdD/mvdE</i>	69
Abb. 43 <i>mvd</i> Precursor PCR mit Spezialfall. Marker GeneRuler DNA Ladder Mix.....	70
Abb. 44 Protein Insert aus der Zeta Toxin Familie bei den Isolaten 806 +808.....	70
Abb. 45 Wiederholung eines Sequenzabschnittes in der IGS Region der Precursorgene.....	71
Abb. 46 Alignment der sich wiederholenden Sequenz in der IGS Region	71
Abb. 47 Überreste des Precursorgens AC in den Isolaten 394 (Moose Lake, CA), 815 und 816 (China Lake, US)	72
Abb. 48 Check PCR	73

Tabellen

Tab. 1 Oligonukleotide.....	22
Tab. 2 Auflistung der untersuchten Isolate.....	30
Tab. 3 PCR Protokoll für DreamTaq DNA Polymerase.	35
Tab. 4 PCR Master Mix für DreamTaq DNA Polymerase.....	36
Tab. 5 PCR Protokoll für Phusion DNA Polymerase.....	36
Tab. 6 PCR Master Mix für Phusion DNA Polymerase.....	36
Tab. 7 Ligationsansatz.....	37
Tab. 8 Auflistung der Peptidgencluster Verteilung.	48
Tab. 9 Auflistung der Isolate, für die keine direkte Nachbarschaft zum <i>oci</i> Gencluster gefunden wurde	58
Tab. 10 Präsenz und Absenz des <i>mvdB</i> (Act) Gens	60
Tab. 11 Isolate für die <i>mvdB</i> Sequenzierung.....	61
Tab. 12 Verbreitung der einzelnen Corepetid Genotypen.....	64
Tab. 13 Auflistung der Abundanzen der einzelnen Precursor Varianten mit den entsprechenden Corepeptide Sequenzen und den dazugehörigen Massen.....	65
Tab. 14 LC/MS nachgewiesene Microviridine	67
Tab. 15 Varianten und Häufigkeit der Leaderpeptide mit den vorkommenden Corepeptiden.....	68

1 Einleitung

1.1 Cyanobakterien

Die Cyanobakterien, auch als Blaualgen bezeichnet, sind gram-negative photoautotrophe Organismen. Die ersten prokaryotischen Fossilien, die den heutigen Cyanobakterien schon sehr ähnlich waren, fand man in 3.5 Milliarden Jahren alten Stromatolithen. Dies war vermutlich auch der Beginn der oxygenen Photosynthese mit zwei Photosystemen, bei der die Cyanobakterien erstmals durch Wasserspaltung Sauerstoff freisetzen (Campbell 2003). Die Cyanobakterien waren damit maßgeblich an der Ausbildung einer Sauerstoffatmosphäre beteiligt. Viele Arten haben auch die Fähigkeit der Stickstofffixierung durch spezielle Zellen (Heterocysten) entwickelt, die als Schutz der Nitrogenase vor Sauerstoff mit einer verdickten Zellwand ausgestattet sind. Aufgrund der hohen ökologischen Anpassungsfähigkeit können die Cyanobakterien nicht nur im Süß- oder Salzwasser überleben, sondern sie besiedeln auch teilweise lebensfeindlichen Räume wie z.B. heiße Thermalquellen, Antarktis, Wüste oder Felswände. Weiters bilden manche Cyanobakterien zum Schutz gegen Trockenheit oder Hitze resistente Sporen (Akineten) aus. Die Zellen sind größer, haben stark verdickte Zellwände und Speicherstoffe eingelagert.

Wie alle Bakterien besitzen auch die Cyanobakterien keinen echten Zellkern und Zellorganellen. Die Photosynthese findet an den Thylakoiden statt, die den Chloroplasten der Pflanzen sehr ähnlich sind. Die unterschiedliche Färbung der Cyanobakterien kommt aufgrund der verschiedenen akzessorischen Pigmenten auf den Thylakoidmembranen zustande. Neben Chlorophyll a enthalten sie zusätzlich noch Phycobiline, Karotinoide und Xanthophylle. Zu den Phycobilinen gehören der blaue Farbstoff Phycocyanin und das rote Phycoerythrin. Dadurch ergibt sich neben der typisch grün-blauen Färbung, auch eine smaragdgrüne, gelb-braune, blau-schwarze, schwarz-grüne, lila oder rote Färbung von Cyanobakterien (Raven P. H. 2005).

Cyanobakterien sind entweder einzellig oder fädig und immer unbegeißelt. Die einzelligen Arten bilden meist Kolonien und sind von einer Gallerthülle umgeben. Die filamentösen Cyanobakterien (z.B. *Planktothrix*) nutzen diese Ausscheidung des Gallertschleims (Polysaccharide) zu einer Gleit-, Rotations oder Oszillationsbewegung (Hoiczky & Baumeister 1998, Anagnostidis & Komarek 1988). Einige Arten haben auch die Möglichkeit im Pelagial durch Luft gefüllter Gasvesikel auf- und abzusteigen bzw. in einer bestimmten Wasserschicht zu schweben.

Die Cyanobakterien vermehren sich nur ungeschlechtlich (vegetativ) durch Zellteilung. Filamentöse Cyanobakterien können während der Zellteilung in kurze Fragmente zerbrechen (Hormogonien), die zur Verbreitung dienen (Streble H. & Krauter D. 2001).

Einige Cyanobakterien Arten sind als Stickstofffixierer hervorragende Symbiosepartner z.B. wie bei dem Farn *Azolla* mit *Anabaena* (Lee et al 2008).

Eine der interessantesten Eigenschaften von Cyanobakterien ist aber die Bildung strukturell diverser Sekundärmetaboliten, die für das Bakterium nicht zwingend lebensnotwendig sind. Dazu gehören Allelochemikalien, die unter anderem das Wachstum anderer Organismen in der Umgebung hemmen können, Antibiotika, Hormone und auch Toxine (Carmichael 1992). Die Bedeutung und Wirkungsweise dieser Sekundärmetaboliten auf ihre Umwelt, im speziellen in Kombination mit anderen Substanzen ist noch größtenteils unklar.

1.2 Cyanobakterienblüten

Bei Cyanobakterien kann es unter bestimmten Umweltbedingungen zu Massenentwicklungen kommen und zur Ausbildung von Algenblüten an der Wasseroberfläche. Die in Kolonien organisierten Cyanobakterien der Gattungen *Microcystis*, *Aphanizomenon* und *Planktothrix* sind dafür bestens bekannt. *Microcystis* und *Aphanizomenon* sind meist in eutrophen Seen und *Planktothrix* im metalimnion von mesotrophen Seen zu finden (Reynolds et al 2002).

Eine der wichtigsten marinen Gattung ist *Trichodesmium*. Dieses Cyanobakterium ist ein wichtiger Stickstofffixierer im Ozean und es bildet Algenblüten im Pazifik, Atlantik und indischen Ozean aus.

In Binnengewässern treten die Algenblüten meist in den späten Sommermonaten und im Herbst auf.

Durch Wind und Wasserströmungen kommt es häufig zu einer ausgeprägten Durchmischung der Wassersäule. Bei anschließenden windstillen Bedingungen kann eine Algenblüte auftreten, da der Auftrieb durch die Gasvesikel der einzelnen Cyanobakterienkolonien stärker ist als die Turbulenzen (Walsby et al 2006). Die Kolonien reagieren dabei auf wenig Licht mit dem Aufsteigen an die Wasseroberfläche.

Das Auftreten von Algenblüten wird durch eine Temperatur $> 15^{\circ}\text{C}$, geringe Durchmischung, Eutrophierung (P, N) und einem erhöhten Eisen Eintrag (Fe) begünstigt. Weitere Vorteile von *Planktothrix* sind der Fraßschutz durch Bildung großer Filamente und Kolonien, mikrobieller Interaktionen mit anderen Bakterien und das Ausnützen von Symbiosen (Paerl et al 2001).

Durch Algenblüten werden auch diverse toxische Sekundärmetaboliten ins Wasser abgegeben, die nicht nur für die aquatischen Organismen schädlich sind, sondern auch für den Menschen ein Gesundheitsrisiko darstellen können.

1.3 Die untersuchten Cyanobakterien

1.3.1 *Planktothrix* spp.

Die Gattung *Planktothrix* spp ist weltweit verbreitet und kommt von den gemäßigten Breiten (Europa), bis zu semiariden (Tucson) und tropischen (Afrika) Klimazonen vor. *Planktothrix* lebt in oligotrophen bis mesotrophen Gewässern, wo sie sich im Metalimnion von tieferen geschichteten Seen, wie auch in seichterem durchmischten Seen einschichtet (Utkilen et al 1985).

Planktothrix ist filamentös aus vielen regelmäßig aneinander gereihten zylindrischen Zellen aufgebaut und bildet Trichome ohne Verzweigungen. Die Trichome werden nur einige µm breit, aber einige mm lang und sind nur sehr schwach von einer Gallerte umgeben. Auf festem Substrat sind die einzelnen Trichome motil. Für das Schweben oder Aufsteigen in Richtung der Lichtquelle in der Wassersäule besitzen sie etliche luftgefüllte Gasvesikel. *Planktothrix* vermehrt sich vegetativ durch Bildung von Hormogonien, die durch eine tote Zelle in einem Trichom (Nekridium) eingeleitet wird. Am Ende eines Trichoms werden die Zellen verjüngt, bei einigen Arten rund oder mit einer Haube (Calyptra) abgeschlossen. Heterocysten und Akineten fehlen komplett. *Planktothrix* ist fähig Algenblüten zubilden (Anagnostidis & Komarek 1988) und weist neben anderen Microcystin Produzenten, wie den Gattungen *Microcystis* und *Anabaena* den höchsten Gehalt an Microcystin auf (Sivonen & Jones, 1999).

Insgesamt existieren über ein Dutzend verschiedene *Planktothrix* Arten. Gemäß Suda et al (2002) werden für diese Arbeit alle Isolate ihrer Pigmentierung in die Arten *P. agardhii* (grünblau) und *P. rubescens* (rot) eingeteilt.

P. agardhii besitzt das blaue Phycobilin Phycocyanin, das zusammen mit dem Chlorophyll für die grünblaue Farbe verantwortlich ist. *P. agardhii* kommt in seichteren und durchmischteren Gewässern vor. *P. agardhii* ist im Vergleich zu *P. rubescens* etwas schmaler und die Endzellen sind nicht kopfig, sondern haben eine flache Haube.

P. rubescens ist durch das Phycobilin Phycoerythrin rötlich gefärbt und hat durch dieses Pigment die Möglichkeit das grüne Licht in den tieferen Wasserschichten zu nutzen. Deswegen findet man *P. rubescens* häufig in tieferen, geschichteten Seen im Metalimnion. Im Vergleich zu *P. agardhii* sind die Zellen von *P. rubescens* breiter und die Trichome schließen mit einer Calyptra ab (Streble H & Krauter D. 2002).

Eine weitere Art aus der tropischen Klimazone hat die gleiche Morphologie und Phycocyanin als akzessorisches Fragment wie *P. agardhii*. Taxonomisch wird diese Art jedoch einer weiteren *Planktothrix* Art, nämlich *P. pseudagardhii* zugewiesen (Suda et al 2002). *P. pseudagardhii* unterscheidet sich deutlich in der optimalen Wachstumstemperatur, die mit 28°C höher ist als bei *P. agardhii* und *P. rubescens*.

1.3.2 *Oscillatoria* spp.

Die Gattung *Oscillatoria* ist morphologisch sehr ähnlich zu *Planktothrix* aufgebaut. Sie sind ebenfalls filamentös, haben üblicherweise keine Gallerte und bevorzugen mesotrophe bis zu eutrophe Gewässer. Die Verbreitung ist weltweit. *Oscillatoria* besitzt keine Gasvesikel und wächst häufig in dicken Matten bis einigen cm Durchmesser auf verschiedenen Untergründen. Diese Matten können sich aber auch lösen und Algenblüten an der Wasseroberfläche bilden. Wie der Name Schwingalge schon aussagt, sind sie in der Lage schwingende Bewegungen auszuführen. Weiters haben sie in der gesamten Zelle Grana verteilt und aufgewickelte Thylakoide. Vermehrung durch Hormogonien. Wie

bei *Planktothrix* fehlen auch Verzweigungen der Trichome, Heterocysten und Akineten (Komarek 1992). Die einzelnen Isolate können mittels 16S rDNA und anderen Markergenen eindeutig von *Planktothrix* unterschieden werden.

1.3.3 *Geitlerinema* spp

Geitlerinema wächst filamentös, unverzweigt und zu *Planktothrix* relativ ähnlich und die Gattungen kommen im selben Habitat vor. Die Trichome sind leicht gewellt oder gewickelt und teilweise sind die Zellen mit markanten Granula (Karotinoide) ausgestattet. Die Endzellen können abgerundet, verengt, gebogen, hakenförmig, spitz sein oder mit einer Calyptra begrenzt sein. *Geitlerinema* kann blaugrün, gelbgrün oder hellgrün sein.

Die Gattung *Geitlerinema* wächst meistens in Form von Matten auf verschiedenen Substraten wie Stein, Holz oder Pflanzen. Reproduktion durch motile Hormogonien, ohne der Hilfe von nekrotischen Zellen. Heterocysten, Akineten und Gasvesikel fehlen. Die Isolate werden nicht einer bestimmten Art zugeordnet, sondern mittels 16S rDNA und anderen Markergenen von *Planktothrix* unterschieden.

1.4 Sekundärmetaboliten

Die Cyanobakterien produzieren eine Vielzahl strukturell sehr diverse Sekundärmetaboliten, die eine toxische als auch bioaktive Wirkung haben können. Bei den Sekundärmetaboliten handelt es sich um ribosomale und nichtribosomale Peptide, Polyketide, Depsipeptide oder Alkaloide, deren Wirkungsspektrum sehr breit sein kann, wie z.B. zytotoxisch, hepatotoxisch, neurotoxisch, antibakteriell, antifungal und Protease-inhibitorisch (Moore 1996; Burja et al 2001). Einige Gattungen haben einen richtigen Cocktail aus vielen verschiedenen Sekundärmetaboliten, deren Funktionen noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Die bekanntesten bioaktiven Sekundärmetaboliten sind die Antibiotika.

1.4.1 Cyanotoxine

Die Cyanotoxine können sowohl für Nutztiere als auch für Menschen ein Gesundheitsrisiko darstellen, wenn diese Toxine bei verstärktem Aufkommen wie z.B. Algenblüten, ins Wasser abgegeben werden. Die Cyanobakterien Toxine kann man in drei Gruppen einordnen: 1) Protein-Phosphatase Inhibitoren, wie die Microcystine oder Nodularin; 2) Neurotoxine, wie das Anatoxin-a oder Saxitoxin; 3) Cytotoxine, wie das Alkaloid Cylindrospermopsin (Chorus et al 2000).

Das bekannteste und am besten untersuchte Cyanotoxin ist das Heptapeptid Microcystin, da es schon zahlreiche Todesfälle bei Mensch und Tier mit kontaminiertem Trinkwasser gegeben hat. Microcystine gelangen dabei erst in höherer Dosis durch die Lyse der Zellen z.B. bei der Wasseraufbereitung oder beim Absterben in das Wasser. Die Gattungen *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Anabaenopsis*, *Fischerella* und *Hapalosiphon* zählen zu den wichtigsten Microcystin Produzenten (Sivonen & Jones 1999).

Peptidfamilie der Microcystine

Das Microcystin ist ein zyklisches Heptapeptid bestehend aus sieben Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 900 – 1100 Da. Der Microcystinsynthetasegencluster (*mcy*) kodiert für folgende Microcystin Struktur: cyclo – D-Ala₍₁₎ – X₍₂₎ – D-MeAsp₍₃₎ – Z₍₄₎ – Adda₍₅₎ – D-Glu₍₆₎ – Mdha₍₇₎ (Abb. 1).

Die kurze Schreibweise der Microcystine MC – XZ, ergibt sich je nach der jeweiligen Aminosäure an der Position 2 und 4. Statt den Platzhalter X oder Z wird eine Aminosäure im „one letter code“ angegeben. Die Synthese erfolgt über eine nicht-ribosomale Peptidsynthetase.

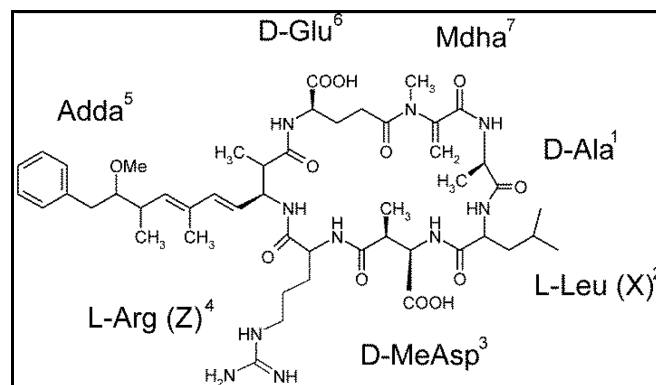


Abb. 1 Allgemeine Microcystin Struktur(hier MC – LR); Fewer et al 2007

Aufgrund der hohen Variabilität an den Positionen 2, 4 und der Möglichkeit von Methylierungen werden immer noch neue Microcystine entdeckt. Bis heute sind schon ca. 90 verschiedene Strukturvarianten beschrieben (Welker & von Döhren 2006). Microcystin zählt zu den Hepatotoxinen und inhibiert die Protein Phosphatase Typ 1 + 2A. Dies hat eine Hyperphosphorylierung von Cytokeratinen zur Folge und schädigt die Leber (Carmichael 1994). Zur Funktion des Microcystins gibt es verschiedene Theorien. Als reiner Fraßschutz kann es nicht dienen (Rohrlack et al 1999) und auch die weite Verbreitung von *mcy* Mutanten, die kein Microcystin realisieren (Christiansen et al 2008), widerspricht dieser These. Eine weitere Idee ist, dass Microcystin als Schutz vor oxidativem Stress durch starke Lichtbestrahlung dient (Dittmann et al 2011).

1.4.2 Nicht toxische (bioaktive) Verbindungen

Cyanobakterien produzieren eine Vielzahl an bioaktiven Verbindungen, die für die Biotechnologie und Biomedizin als pharmakologische Wirkstoffe sehr interessant sind. Das Potential der Cyanobakterien als Quelle von bioaktiven Substanzen scheint schier unerschöpflich, denn es werden immer wieder neue Komponenten entdeckt (Welker & von Döhren 2006).

Besonders reich an bioaktiven Verbindungen sind die marinen Cyanobakterien der Gattung *Symploca* oder *Lyngbya*, die unter anderem ein identisches analog zu Dolastatin 10, ein Antikrebs Medikament produzieren. Aber auch die teilweise terrestrisch lebenden Cyanobakterien der Gattung *Nostoc* produzieren interessante bioaktive Stoffe, wie z.B. Cryptophycin, ein effizientes Antitumor Depsipeptid oder Cyanovirin-N, das den Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) inaktiviert (Sivonen & Börner 2008). Süßwasser Cyanobakterien wie die Gattung *Planktothrix* haben ebenfalls ein breites Spektrum an verschiedenen bioaktiven Verbindungen, die ribosomal als auch nicht-ribosomal synthetisiert werden. Dazu zählen lineare Peptide (Aeruginosine, Microginine), zyklische Depsipetide (Cyanopeptoline) oder trizyklische Microviridine, um nur einige zu nennen.

Peptidfamilie der Aeruginosine

Die Aeruginoside sind lineare nicht-ribosomale Oligopeptide mit unüblichen funktionellen Gruppen. Das Kennzeichen der Aeruginoside ist die 2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole (Choi) Gruppe, die sulfoniert oder chloriert sein kann. Eine weitere funktionelle Gruppe, die bei allen Aeruginosiden am N-Terminus vorkommt, ist die (4-hydroxy) phenyllactic acid ((H)pla), die chloriert, sulfoniert oder bromiert sein kann. Am C-Terminus befindet sich stets ein Arginin Derivat (Abb. 2). Bei *Planktothrix* wurde zusätzlich noch eine Glykosylation der Choi Gruppe der Aeruginoside gefunden. Die Gattungen *Planktothrix*, *Microcystis* und *Nodularia* zählen zu den wichtigsten Produzenten der Aeruginosine (Ishida et al 2009; Welker & von Döhren 2006).

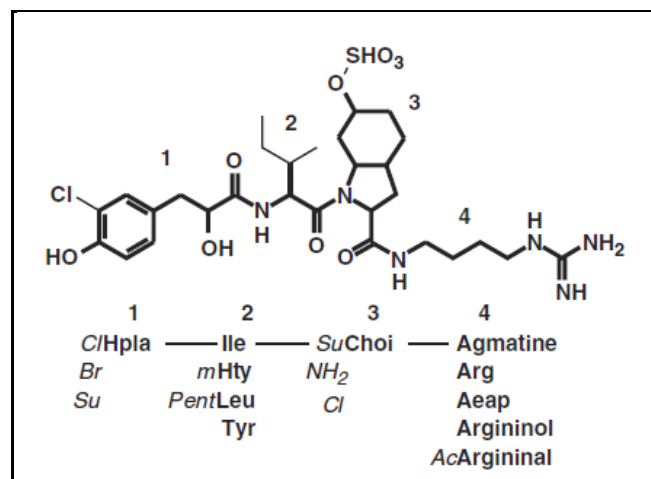


Abb. 2 Allgemeine Aeruginosin Struktur (Welker & von Döhren 2006)

Die Funktion von Aeruginosin ist die Inhibition verschiedener Serinproteasen wie Thrombin und Trypsin zum Schutz vor Fraßfeinden (Ishida et al 2007).

Peptidfamilie der Anabaenopeptine

Die Anabaenopeptine sind zyklische nicht-ribosomale Hexapeptide. Über eine konservierte Ureido – Verbindung wird das D-Lysin an Position 2 mit der Carboxy – Gruppe der AS Seitenkette an Position 6 verknüpft und damit der Ring geschlossen. An Position 5 werden nur methylierte Aminosäuren eingebaut (Abb. 3). Weiters existieren zwei Startermodule mit unterschiedlicher Substratempfindlichkeit für Arginin/Lysin (Modul 1) oder für Tyrosin (Modul 2), dass zu drei Anabaenopeptin Varianten führt (Rouhiainen et al 2010). Wichtige Vertreter für Anabaenopeptine sind die Gattungen *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc* und *Nodularia*.

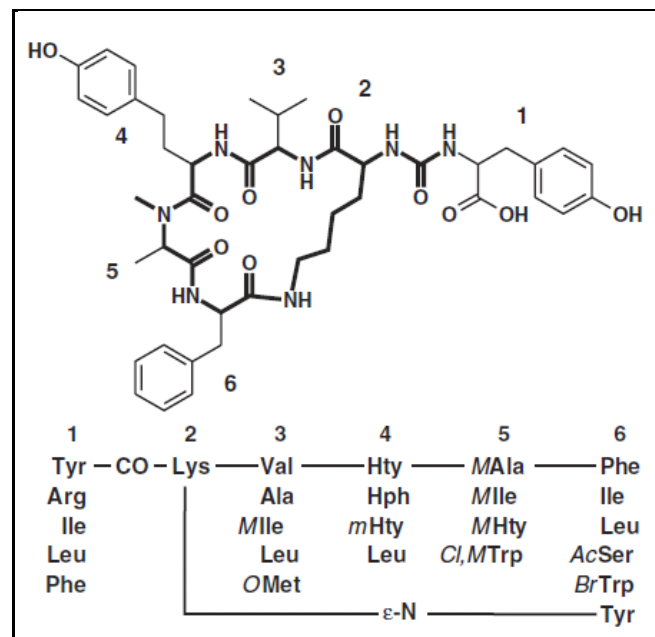


Abb. 3 Allgemeine Anabaenopeptin Struktur (Welker & von Döhren 2006)

Die Funktion von Anabaenopeptin ist die Inhibition der Protease Carboxypeptidase A, die bei der Verdauung der Nahrung eine wichtige Rolle spielt (Murakami et al 2000).

Peptidfamilie der Cyanopeptoline

Cyanopeptoline sind zyklische nicht-ribosomale Heptapeptide (Depsipeptide) mit einer sehr variablen Struktur. Die möglichen Seitenketten setzen sich aus aliphatischen Fettsäuren (Ameisensäure bis Octansäure), Glycerinsäure und weiteren Aminosäuren zusammen. Auf Position 2 im Ring ist die Variation am größten. Die einzigen konservierten Bereiche sind auf Positionen 1 mit Threonin und Position 3 mit 3-amino-6-hydroxy-2-piperidone (Ahp). Nur in wenigen Fällen wird das Threonin durch ein hydroxy-methyl Prolin ersetzt (Abb. 4). Durch diese hohe Anzahl an verschiedenen

Strukturvarianten der Cyanopeptoline kann die Molekülmasse von ca. 770 Da bis 1180 Da betragen (Welker & von Döhren 2006). Die wichtigsten Gattungen für Cyanopeptolin Produzenten sind *Anabaena*, *Microcystis* und *Planktothrix*.

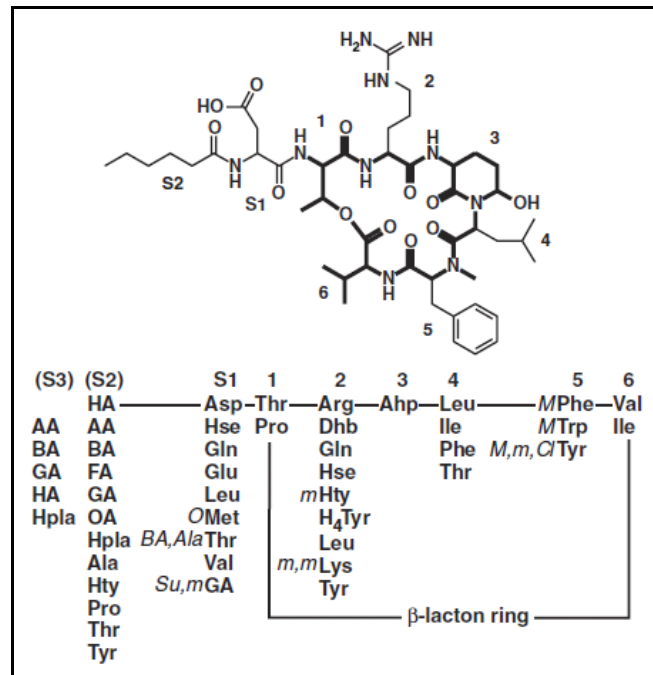


Abb. 4 Allgemeine Cyanopeptolin Struktur (Welker & von Döhren 2006)

Cyanopeptolin inhibiert verschiedene Serinproteasen, die eine wichtige Rolle bei der Nahrungsverdauung spielen, wie z.B. Trypsin und Chymotrypsin. Cyanopeptolin kann für aquatische Crustaceen toxisch sein (Blom et al 2003).

Peptidfamilie der Microginine

Microginine sind lineare nicht-ribosomale Lipopeptide von vier bis sechs Aminosäuren, wobei die letzte AS Tyrosin am C-terminalen Ende nicht bei jeder Variante vorhanden ist. Charakteristisch für Microginine ist die N-terminale modifizierte 3-amino-2-hydroxy Dekansäure (Ahda), die auch chloriert oder methyliert vorliegen kann. Mit einigen verschiedenen Substitutionen ist die Position 2 am variabelsten (Abb. 5).

Die bekanntesten Vertreter der Microginine stammen von den Gattungen *Microcystis*, *Planktothrix*, *Lyngbya* und *Nostoc*.

Microviridine inhibieren verschiedene Serinproteasen wie Chymotrypsin und Elastasen, z.B. im Verdauungstrakt von Fraßfeinden.

Peptidfamilie der Planktocycline

Planktocyclin gehört zu der Gruppe der weit verbreiteten Cyanobactine. Cyanobactine sind kleine zyklische ribosomale Peptide, die aus 6 – 20 Aminosäuren aufgebaut sind und eine Vielzahl an posttranslationalen Modifikationen aufweisen können (Abb. 7). Als Substrat dieser Modifikationen dient ein kurzer ribosomal kodierter Precursor. Ein weiterer (energetischer) Vorteil der Cyanobactine ist der relativ kleine (< 20 kbp) Gencluster im Vergleich zu den NRPS Gencluster (Donia & Schmidt 2011).

Zu den Cyanobactinen gehören auch die Anacyclamide, Patellamide, Trunkamide, Tenuocyclamide, Patellin und Microcyclamide, die alle ähnliche Gene aufweisen z.B. die C- und N-terminale Proteasen für die Zirkularisierung der PC Peptide (Leikoski et al 2010). In diesen Gattungen sind schon Cyanobactine bzw. homologe Gene nachgewiesen worden: *Planktothrix*, *Anabaena*, *Cyanothece*, *Microcystis*, *Arthrospira*, *Oscillatoria*, *Prochloron*, *Nostoc*, *Trichodesmium* und *Lyngbya*. Das abgebildete Planktocyclin wurde aus *P. rubescens* isoliert.

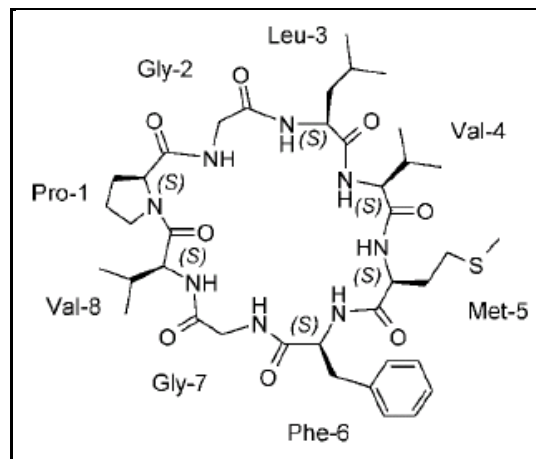


Abb. 7 Allgemeine Planktocyclin Struktur (Welker & von Döhren 2006)

Die Funktion von Planktocyclin ist die Inhibition verschiedener Serinproteasen wie Trypsin oder Chymotrypsin und es dient dadurch ebenfalls als möglicher Fraßschutz (Baumann et al 2007).

1.5 Biosynthesewege

Bei Cyanobakterien treten sowohl toxische als auch nicht-toxische (bioaktive) Verbindungen auf, die über nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS), teilweise mit Polyketidsynthetasen (PKS) gekoppelt oder über den ribosomalen Peptidsynthese (RPS) Weg synthetisiert werden.

1.5.1 Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen und Polyketidsynthetasen

Bei dem nicht-ribosomalen System handelt es sich um einen modular aufgebauten Polyzym-Komplex, der neben den 20 proteinogenen AS noch weitere nicht-proteinogene AS, Hydroxysäuren, Carboxysäuren, D-AS, und Amine zur Peptid-Assemblierung nutzen kann. Es sind bis jetzt über 300 mögliche Substrate bekannt. Es können lineare, verzweigte oder zyklische Strukturen gebildet werden. Dieser modulare Aufbau der NRPS folgt dem Multienzyme Thiotemplate Mechanismus (Kleinkauf & von Döhren 1996).

Jedes Peptidsynthetase-Modul besteht aus mehreren Domänen, die für die Erkennung, Aktivierung und Einbau einer Aminosäure in das Peptid verantwortlich ist. Hierfür ist mindestens ein Minimalmodul, bestehend aus einer Adenylierungsdomäne (A-Domäne), Thiolierungsdomäne (T-Domäne) und einer Kondensationsdomäne (C-Domäne) nötig. Ein Minimalmodul kann durch zusätzliche Domänen ergänzt werden. Bei diesen spezifischen Domänen kann es sich z.B. um eine Thioesterase (TE), Epimerisation (E), Methyltransferase (M) oder Sulphotransferase (S) handeln (Abb. 8).

Die NRPS kommen auch oft in Kombination mit Polyketidsynthetasen (PKS) vor und bilden sogenannte Mischsysteme. Die PKS sind ebenfalls modular aufgebaut, wobei jedes Modul für den Einbau einer Carbonsäure zuständig ist. Die Substrate für die PKS können Acetyl-CoA oder Malonyl-CoA sein.

Die Minimalmodule der PKS bestehen aus einer Ketosynthasedomäne (KS), Acyltransferasedomäne (AT) und einer Acylcarrier-Proteindomäne (ACP). Zusätzliche Domänen eines Moduls können eine Ketoreduktase (KR), Dehydrogenase (DH), Enoylreduktase (ER) oder eine Thioesterase (TE) sein (Hopwood 1997).

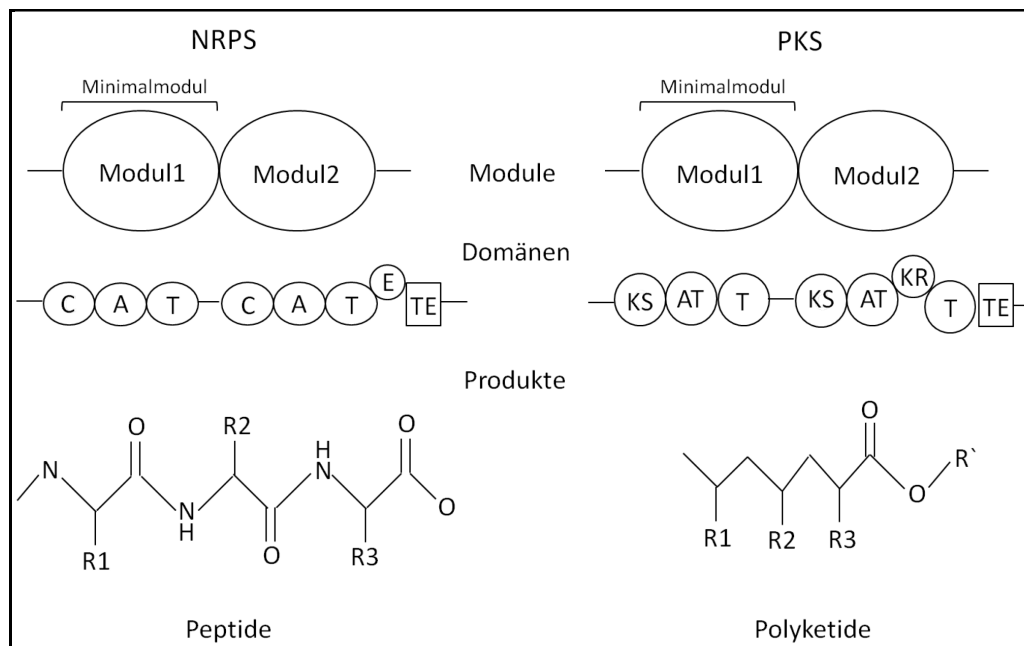


Abb. 8 Schematischer Aufbau einer NRPS und PKS

1.5.2 Ribosomale Peptidsynthese

Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass bioaktive Sekundärmetaboliten mit ähnlich komplexen Strukturen auch über den ribosomalen Weg synthetisiert werden können. Im Vergleich zu den NRPS sind die RPS Gencluster wesentlich kleiner und als Substrat werden nur proteinogene AS genutzt. Der generelle Aufbau eines RPS Genclusters umfasst Gene für ein Prä-Peptid, für posttranslationale Modifikation (PTM), eine Protease und einen Transporter.

Das anfängliche ribosomal produzierte Prä-Peptid wird als Precursor (PC) bezeichnet und besteht aus einem Leaderpeptid und einem Corepeptid. Aus dem Corepeptid wird durch PTM die eigentliche (bio)aktive Verbindung. Bei manchen Organismen ist N-terminal noch ein Signalpeptid und C-terminal eine Erkennungssequenz vorhanden (Abb. 9).

Das Leaderpeptid dient vermutlich als Sekretionssignal oder als Erkennungsmuster für die Enzyme der PTM. Die mögliche Anheftung der PTM Enzyme an das Leaderpeptid hat nicht nur Strukturveränderungen des Corepeptids (Faltung, Zyklisierung usw.) zur Folge, sondern es wird auch vermutet, dass der PC während der Biosynthese gegen einen proteolytischen Abbau geschützt wird. Das Precursorpeptid bleibt inaktiv bis eine geeignete Protease (Leaderpeptidase) das Leaderpeptid abspaltet und das Corepeptid durch einen Transporter an den Wirkungsort transloziert wird. Manchmal ist die Protease Teil des ABC Transporters (Oman & van der Donk 2009).

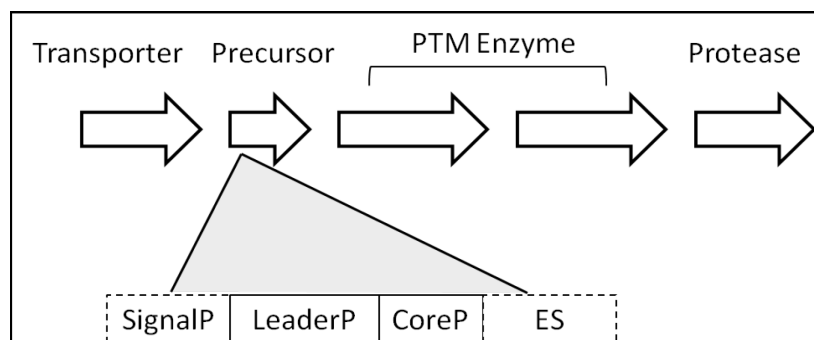


Abb. 9 Schematischer Aufbau eines RPS Genclusters. Die strichlierten PC Abschnitte sind variabel. SignalP Signalpeptid, LeaderP Leaderpeptid, CoreP Corepeptid, ES Erkennungssequenz

1.6 Aufbau der einzelnen Gencluster

Die unterschiedlich Großen IGS Regionen werden aufgrund der Übersichtlichkeit bei allen Gencluster Abbildungen weggelassen.

Microcystin

Der *mcy* Gencluster von *Planktothrix* umfasst 9 Gene, ist ca. 55 kb groß und enthält NRPS, PKS und gemischte Module. *mcyT* kodiert für eine Thioesterase TypII, *mcyD* kodiert für eine PKS, *mcyAB* und *C* codieren für eine NRPS, *mcyE* und *G* sind Hybrid Systeme, *mcyH* kodiert für einen ABC Transporter und *mcyJ* für eine O-Methyltransferase. Am Ende von *mcyC* (C-terminal) ist eine weitere Thioesterase Domäne vorhanden (Christiansen et al 2003).

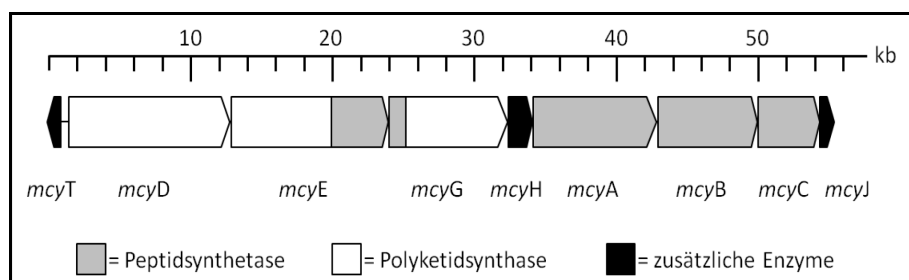


Abb. 10 Schematischer Aufbau des Microcystinsynthetase-Genclusters in *Planktothrix* (Christiansen et al 2003)

Aeruginosin

Der *aer* Gencluster umfasst bei *Planktothrix* meistens ca. 12 Gene und einige ORFs, deren Funktion noch nicht bestimmt werden konnte. Der Gencluster ist ca. 25 kb groß. *aerA* ist ein Hybrid aus NRPS/PKS, *aerB* und *aerG* codieren für eine NRPS, *aerC* kodiert für eine Oxygenase, *aerD* kodiert für eine Decarboxylase, *aerF* kodiert für eine Reduktase, *aerH* kodiert für eine Dioxygenase, *aerI* und *aerK* codieren für eine Glycosyltransferase, die Funktion von *aerL* ist unbekannt, *aerJ* kodiert für einen ABC Transporter. Weiters konnte gezeigt werden, dass *aerDEF* und *K* an der Bildung der Choi Struktur beteiligt sind (Ishida et al 2009; Rounge et al 2009).

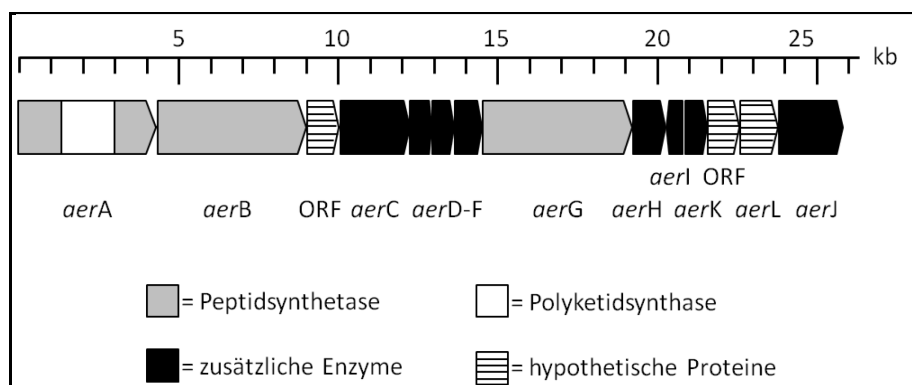


Abb. 11 Schematischer Aufbau der Aeruginosinsynthetase-Genclusters in *Planktothrix* (Rounge et al 2009)

Anabaenopeptin

Der *apn* Gencluster besteht aus 5 Genen und ist ca. 24 kb groß. *apnABC* und D codieren für eine NRPS. Das Gen *apnE* kodiert für einen ABC Transporter. Bei dem Stamm *P.agardhii* NIVA CYA 126/8 konnte eine bispezifische A-Domäne nachgewiesen werden. *ApnA* besteht aus zwei Modulen, wobei die A-Domäne aus dem ersten Modul (*apnA* A₁) fähig ist, entweder die AS Arginin oder Tyrosin an Position 1 im Ring einzubauen. Dies ist aufgrund von Punktmutationen möglich geworden (Christiansen et al 2011).

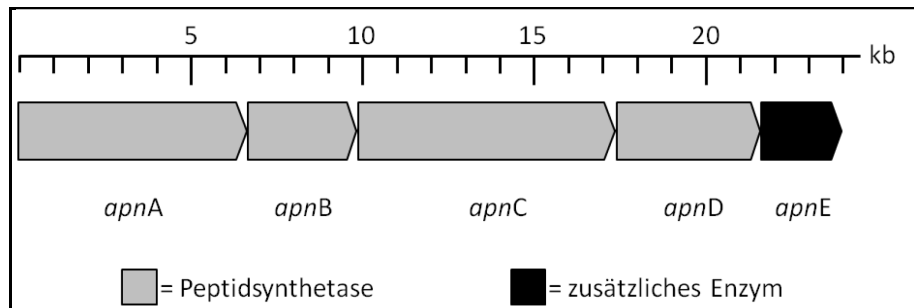


Abb. 12 Schematischer Aufbau des Anabaenopeptinsynthetase-Genclusters in *Planktothrix* (Christiansen et al 2011)

Cyanopeptolin

Der *oci* Gencluster umfasst 4 – 6 Gene und ist ca. 32 kb groß. *ociAB* und C codieren für NRPS. *ociD* kodiert für einen ABC Transporter.

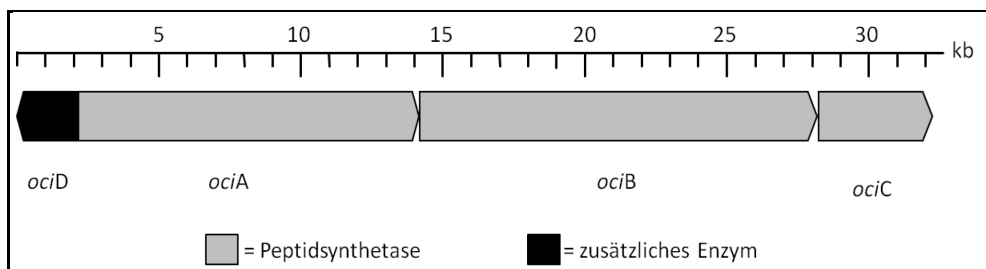


Abb. 13 Schematischer Aufbau des Cyanopeptolinsynthetase-Genclusters in *Planktothrix* (Rounge et al 2008)

Bei dem Stamm *P. rubescens* NIVA CYA 98 befindet sich zwischen *ociB* und *ociC* noch zwei sehr kleine Gene (*ociG* & *ociH*), deren Funktion nicht bekannt ist (EMBL: AM990463 Rounge et al 2009). In dem Stamm *P. agardhii* NIES 205 ist ein weiteres zusätzliches Gen (*ociE*) vorhanden, das für den Einbau der AS Threonin zuständig ist (GenBank: EU109504 Rounge et al 2008).

Microginin

Der *mic* Gencluster besteht aus 4 Genen und ist ca. 21 kb groß. *MicA* kodiert für ein Hybridsystem, *micC* und *micD* codieren für NRPS, *micE* kodiert für einen ABC Transporter.

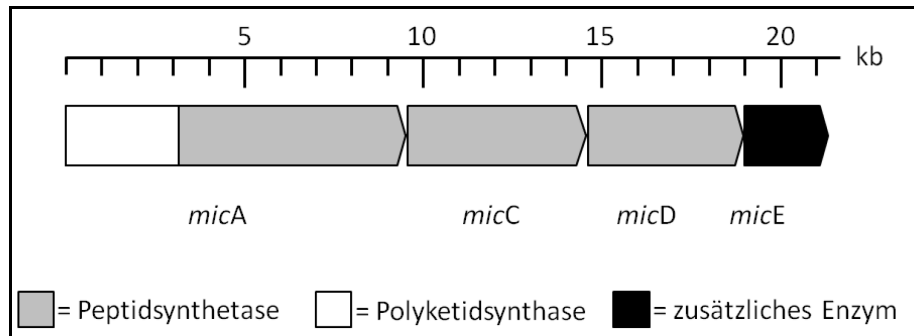


Abb. 14 Schematischer Aufbau des Microgininsynthetase-Genclusters in *Planktothrix* (Kramer 2009)

Microviridin

Der *mvd* Gencluster besteht aus min. 4 - 7 Genen und ist ca. 5,5 kb groß (ohne *adpE* und *adpF*). *MvdA* kodiert für einen ABC Transporter, *mvdB* kodiert für eine Acetyltransferase, *mvdC* und *mvdD* codieren für eine GRASP ähnliche Ligase. *MvdD* bildet zuerst zwei Esterbrücken aus und letztendlich macht *mvdC* noch eine Amidbindung, dass zu einem trizyklischem Microviridin führt. *MvdEF* und *G* codieren für mögliche PC (Prä-Peptide). *AdpE* und *adpF* haben homologe Sequenzen zu Genen im Cyanopeptolingencluster. Eine Funktion dieser zwei Gene für den *mvd* Gencluster ist bisher nicht nachweisbar (Philmus et al 2008; Philmus et al 2009).

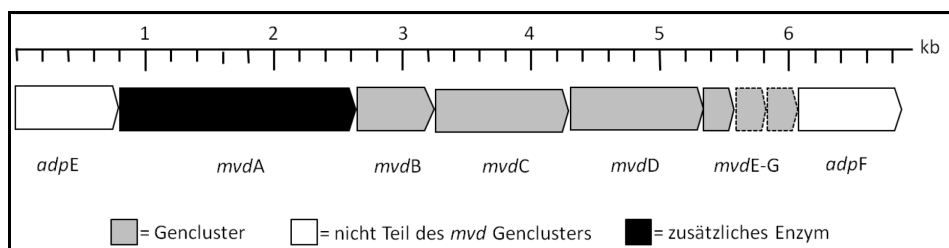


Abb. 15 Schematischer Aufbau des Microviridin-Genclusters in *Planktothrix* (Philmus et al 2008)

Planktocyclin

Der *pag* Gencluster ist sehr variabel und umfasst viele Gene mit teilweiser unbekannter Funktion. Der Gencluster ist ca. 13,5 kb groß. *PagB* und *C* codieren für ein nicht bekanntes hypothetisches Protein. *PagA* kodiert für eine N-terminale Protease, *pagG* für eine C-terminale Protease und *pagF* kodiert für eine Prenyltransferase. Die weiteren Gene, die dem *pag* Gencluster zugewiesen werden konnten codieren für verschiedene Precursorpeptide. Weiters sind noch zwei mobile Elemente entdeckt worden. Die Funktion der vielen Gene, die für hypothetischen Proteine codieren ist unbekannt (Donia & Schmidt 2011).

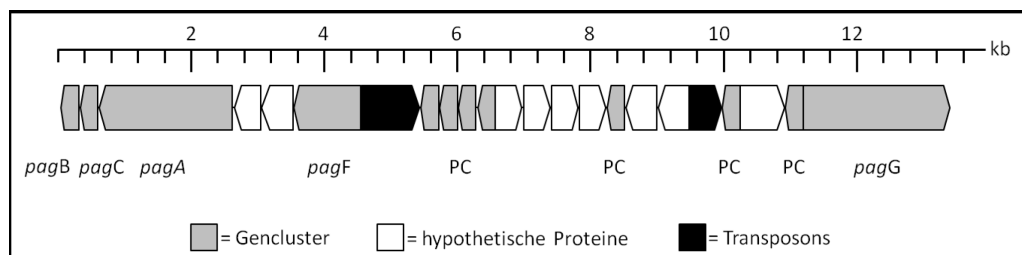


Abb. 16 Schematischer Aufbau des Planktocyclin-Genclusters in *Planktothrix* (Donia & Schmidt 2011)

1.7 Horizontaler Gentransfer oder Verlust Theorie der Peptidgencluster

In der Evolution der Bakterien ist der horizontale Gentransfer (HGT) ein entscheidender Faktor, weil durch Genaustausch zwischen nah verwandten, aber auch evolutionär weit entfernten Bakterienarten eine schnellere Anpassung an veränderte Umweltbedingungen und ein Erwerb neuer Fähigkeiten (Resistenzen) ermöglicht wird.

Der HGT kann mittels Transformation, Transduktion, Transposition oder Konjugation stattfinden und die mögliche Integration der neuen DNA ins Genom wird durch homologe Rekombination bewerkstelligt.

Bei dem am besten untersuchten Cyanotoxin Microcystin haben Untersuchungen gezeigt, dass es inaktive Isolate gibt, die trotz Vorhandenseins des *mcy* Genclusters die Fähigkeit verloren haben, Microcystin zu synthetisieren. Bei diesen Isolaten ist der *mcy* Gencluster durch Mutationen (Insertionen und Deletionen) verändert (Christiansen et al 2006). Weiters sind Isolate entdeckt worden, die den *mcy* Gencluster verloren haben. Bei genaueren Analysen sind bei diesen nicht toxischen Isolaten noch Genreste von *mcyT* und *mcyJ* gefunden worden. Der Verlust ist auf ein mobiles Element (IS- Element) zurückzuführen, denn beim Verlust des *mcy* Genclusters blieben Reste des IS-Elements zurück (Christiansen et al 2008).

Das häufige Vorkommen inaktiver und nicht-toxischer *mcy* Genotypen bekräftigt die Theorie, dass es im Falle des Microcystin zu keinem HGT gekommen ist, sondern der *mcy* Gencluster und somit auch die Microcystinsynthese im Laufe der Evolution verloren ging. Phylogenetische Untersuchungen

haben eine Korrelation der Evolution der sogenannten „housekeeping-genes“ mit dem *mcy* Gencluster gezeigt, was auf einen gemeinsamen Vorfahren schließen lässt (Rantala et al 2004).

1.7.1 Insertionselemente (IS-Element)

Mobile Elemente, sogenannte IS-Element oder Transposons sind für genetische Veränderungen, wie Deletionen oder Insertionen im Genom verantwortlich. Diese mobilen Elemente können variable Genregionen verschiedener Größe aus dem Genom ausschneiden und an einer anderen Stelle wieder inserieren. Daher kommt auch der Ausdruck „springende Gene“.

Die IS-Elemente tragen nur das Transposase Gen und können bis zu 2,5 kb groß sein. Ein Transposon hingegen ist größer (bis zu 60 kb) und kodiert neben dem Transposasegen auch noch für weitere Gene. Für das Herausschneiden und Inserieren der DNA ist das Enzym Transposase zuständig. Dieses wird beidseitig von einer ca. 50 bp langen gegenläufig identischen Sequenz, dem „inverted repeat“ (IR) flankiert, die als binding site für die Transposase dienen. Direkt angrenzend sind ca. 10 bp einer gleichgerichteten Sequenz, den „direct repeats“ (DR), die meist als Erkennungssequenz der Transposase fungieren. Die DR sind Teil der Wirts-DNA und werden beim Herausschneiden oder Inserieren der Transposase durch zelleigene Reparaturenzyme wieder aufgefüllt, da ähnlich wie bei einem Restriktionsenzym „sticky ends“ entstehen.

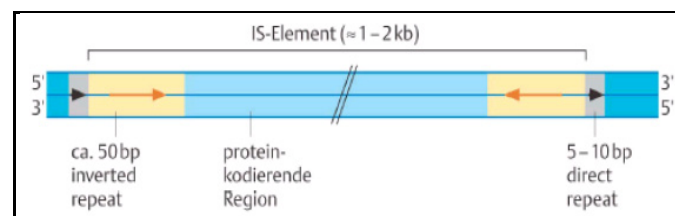


Abb. 17 Schematische Darstellung eines IS-Elementes

Die folgende Abb. 18 zeigt einen Überblick der Positionen und Größen der entdeckten Mutationen im *mcy* Gencluster von *Planktothrix*, die zu einer inaktiven Biosynthese führen.

Mutationen (Insertionen und Deletionen) und Rekombinationen haben einen wichtigen Einfluss auf die genotypische Diversität in der Microcystinsynthese.

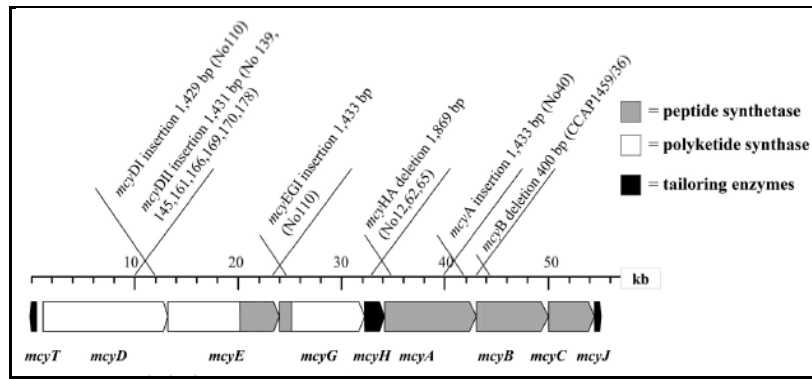


Abb. 18 Darstellung der *mcy* Mutationen in *Planktothrix* (Christiansen et al 2006)

1.8 Funktionelle Rekombinationen im *mcy* Gencluster

Die strukturelle Vielfalt des Microcystins ist sehr groß. Bis heute sind mehr als 90 Strukturvarianten des Microcystins entdeckt worden. Dies ist vor allem auf die teilweise nicht sehr spezifischen Module zurückzuführen. Ein Beispiel hierfür ist die Bindetasche der A-Domäne, die eine Variabilität ca. 38 % der Nukleotidsequenz bei *Microcystis* aufweist. Die Ursache hierfür können Rekombinationsereignisse sein (Dittmann et al 1997, Kurmayer et al 2005).

Durch den Verlust von Methylgruppen bei *Planktothrix* entstehen weitere Strukturvarianten. Im Vergleich bei *Microcystis* dominieren die nicht-methylierten Microcystine. Dies hat auch einen Einfluss auf die toxische Eigenschaften (Fastner et al 1999).

Eine weitere Strukturveränderung ist bei einem Vergleich verschiedener *mcyAA*d1 (erste A-Domäne) entdeckt worden und bei einer gleichzeitigen Insertion von einer N-Methyltransferase (NMT). Das Vorhandensein der NMT korreliert mit dem Einbau von Mdha (N-Methyl-Dehydroalanin) an Position 7 des Microcystin-Moleküls. Bei Fehlen der NMT kommt es zum Einbau von Dhb (Dehydrobutyrin) an dieser Position (Kurmayer et al 2005).

1.9 Ziele dieser Arbeit

Die filamentöse Cyanobakterien Gattung *Planktothrix* produziert neben dem bekannten gesundheitsgefährdenden Heptapeptid Microcystin auch noch zahlreiche weitere bioaktive Peptide. Aufgrund dieser hohen Diversität wäre es wichtig (1) einen Überblick der Verbreitung der genetischen Basis für diese bioaktiven Peptide in toxischen bzw. nicht-toxischen Isolaten innerhalb der Gattung *Planktothrix* zu erhalten und weiters (2) bei nicht Vorhandensein eines Peptidgenclusters, heraus zu finden, ob dieser verloren wurde. Weiters wurde versucht (3) die Regelmäßigkeit der Bildung eines Multipeptidgencluster bestehend aus Microviridin, Anabaenopeptin und Cyanopeptolin (laut einer Genomsequenzierung von *P. agardhii* NIVA CYA 126/8) in den Isolaten zu überprüfen.

Während die Peptide Aeruginosin, Anabaenopeptin, Cyanopeptolin, Microcystin und Microginin nicht-ribosomal synthetisiert werden, werden die Peptide Microviridin und Planktocyclin ribosomal synthetisiert. Die nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) sind ein modular aufgebauter

Polyenzym-Komplex, die neben den 20 proteinogenen Aminosäuren (AS) noch weitere nicht-proteinogene AS, Hydroxysäuren, Carboxysäuren, D-AS, und Amine zur Peptid-Assemblierung nutzen können. Im Vergleich zu den NRPS sind die ribosomalen Peptidsynthese (RPS) Gencluster wesentlich kleiner und als Substrat werden nur proteinogene AS genutzt.

Aufgrund des wesentlich kleineren Genclusters des ribosomal synthetisierten Peptids Microviridin wäre eine Verbreitung durch horizontalen Gentransfer vorstellbar. Es wäre auch eine raschere Evolution der Microviridine durch nichtsynonyme Substitutionen des Tripletcodes möglich, die zu direkten strukturellen Veränderungen führen könnten. (4) Ziel war es daher anhand der genetischen Sequenzen eine genaue Strukturvorhersage zu treffen und die Synthese der Microviridine zu überprüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

VWR

Agarose DNA Grade Electran

LTF Labortechnik

Natriumdodecylsulfat 20% (SDS)

Becton Dickinson

Bacto Agar
Difco LB Broth, Miller (Luria-Bertani)
Bacto Hefeextrakt
Bacto Triptone

AustrAlco

Ethanol 99% C_2H_6O

Sigma Aldrich

Borsäure 99,5% H_3BO_3
Trisma Base $C_4H_{11}NO_3$
Ficoll PM400
Kaliumacetat $C_2H_3KO_2$
Ethylendiamintetraessigsäure Magnesium-Dinatriumsalz Hydrat $C_{10}H_{12}MgN_2Na_2O_8aq$
Rubidiumchlorid $RbCl$
Ethidiumbromid 10mg/ml
Chloramphenicol $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$
Ampicillin Natriumsalz $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$
Glycerol $C_3H_8O_3$
Bromphenolblau
D-Glucose $C_6H_{12}O_6$

Carl Roth GmbH

Isopropanol (2-Propanol) C_3H_8O
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1
Chlorophorm/Isoamylalkohol 24:1
HEPES $C_8H_{18}N_2O_4S$
MOPS Puffer 99%
TRIS-Hydrochlorid $C_4H_{11}NO_3HCl$
D-Saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$
HEPES Puffer 99.5% $C_8H_{18}N_2O_4S$

Thermo Scientific

Fermentas PEG 4000 (Polyethylenglycol)
Fermentas Glycogen
Fermentas 10x FastDigest Green Puffer
Fermentas 10x DreamTaq Puffer
Fermentas 5X Phusion HF Puffer
Fermentas 25mM $MgCl_2$
Fermentas 5x T4 DNA Polymerase Puffer
Fermentas 10x T4 DNA Ligase Puffer

Merck Eurolab

Hydrogenchlorid HCl
Calciumchlorid CaCl_2
Kaliumhydroxid KOH
Mangan (II) Chlorid Tetrahydrat $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Natriumacetat $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$
Natriumchlorid NaCl
Natriumhydroxid NaOH
Kaliumchlorid KCl
Magnesiumchlorid Hexahydrat $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Bio-Rad Laboratories

Xylene Cyanol FF

2.1.2 Enzyme**Thermo Scientific**

Fermentas Restriktionsendonukleasen (FastDigest, conventional)
Fermentas Klenow Fragment
Fermentas T4 DNA Polymerase
Fermentas T4 Polynucleotid Kinase
Fermentas Proteinase K
Fermentas T4 DNA Ligase
Fermentas DreamTaq DNA Polymerase
Fermentas Phusion High Fidelity DNA Polymerase

New England Biolabs

Restriktionsendonukleasen
Antarctic Phosphatase

Sigma Aldrich

Lysozyme

2.1.3 Nukleinsäuren**Thermo Scientific**

Fermentas dNTP Set 100mM
Fermentas Lambda DNA $0.3\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Tab. 1 Oligonukleotide. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert und mit MilliQ Wasser auf eine Konzentration von 100µM eingestellt. Zur Verwendung in PCR's wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt.

^a Primerorientierung: F, Forward Primer; R, Reverse Primer

^b **Te**, Thioesterase; **Ahp**, 3-amino-6-hydroxy-2-piperidone; **A-Domäne**, Adenylierungsdomäne; **C-Domäne**, Kondensationsdomäne; **NMT**, N-methyltransferase; **AMT**, Aminotransferase; **Epi**, Epimerase; **choi**, 2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole; **IGS**, intergenischer Bereich; **Clbr**, Clusterbrücke; **Pm**, Polymorphismus; **Cm**, Chloramphenicol

^c mit **Fermentas Phusion High Fidelity DNA Polymerase** amplifiziert; der Rest wurde mit **Fermentas Taq DNA Polymerase** amplifiziert

^d mit N-Methyldehydroalanin (**Mdha**) 5016bp oder mit Dehydrobutyrat (**Dhb**) 3792bp

^e mit Acetyltransferase (**Act**) 4700bp oder ohne Act 4200bp

Primername ^a	Sequenz (5'-3')	Genlocus ^b	T _m (°C)	Größe (bp)
Cyanopeptolin				
cptDTe_F61	GATCTCTATCAACAGTTTGGAGCAA	ociC, Te	61	690
cptDTe_R61	ACTGTTCCGGCTAACACTTGAACAT			
ociB_F58 ^c	TGGTTTTTAGATCAATTTGAGTCCG	ociB, Ahp	66	512
ociB_R58 ^c	CCACTGTTTTTGCCAAAGAGTG			
ociA_F62	GAAATTGAGGCATTATTGGCATCT	ociA, A-Domäne	62	416
ociA_R62	TGTGCTACTAATTGAGTCGCCAGT			
CptSc1+	CCCGACTGGCTAGGTTTCTAATAC	ociD	60	~2000
CptSc1-	CAAGCGACAATAATCCTATCTCC			
CptSc2+	GGAGATAGGATTAGTTGTCGCTTG			
CptSc2-	CAAAGACAGCAAAGACATCATC			
CptSc3+	GATGATGTCTTTGCTGTCTTTG	ociA		
CptSc3-	CTGACGTTGTGGAGAACTTGTT			
CptSc4+	AACAAGTTTCTCCACAACGTCAG			
CptSc4-	TAAAGAACGTTTCGACACAAATTCC			
CptSc5.1+	GGAATTTGTGTCGAACGTTCTTTA			
CptSc5.12-	CCAATTGCTTTCTGGTTTGATTAT			
CptSc5.2-	CATAAAGTTTAGACGTTCTGGGG			
CptSc5.2+	CCCCAGGAACGTCTAAACTTTATG			
CptSc6+	ATAATCAAACCAGAAAGCAATTGG			
CptSc6-	GTCAGTTCAGAACTAACTGATGCC			
CptSc7+	GGCATCAGTTAGTTTCTGAACTGAC	ociB		
CptSc7-	GCGATTACGGTTAGTAATAGGCG			
CptSc8+	CGCCTATTACTAACCGTAATCGC			
CptSc8-	CGCCTATTACTAACCGTAATCGC			
CptSc9+	CCGGATTGACAATCAGGTAAAA			
CptSc9-	AGTAAGGGTAATTGGGAAATCCG			
CptSc10+	CGGATTTCCTCAATTACCCTTACT			
CptSc10-	CTAACTGATTGACAAACCAGAGGC			
CptSc11+	GCCTCTGGTTTGTCAATCAGTTAG			
CptSc11-	CGTAATCGCTCCATTAAGGGTAA			
CptSc12+	TTACCCTTAATGGAGCGATTACG			
CptSc12-	GCCGTACAGAGGATTATTCGTGTA			
CptSc13+	TACACGAATAATCCTCTGTACGGC	ociC		
CptSc13-	ATTTGGGTAATAGTGCCAGCAGT			
CptSc14+	ACTGCTGGCACTATTACCCAAAT			

Primername ^a	Sequenz (5' -3')	Genlocus ^b	Tm (°C)	Größe (bp)
Cyanopeptolin				
CptSc14-	GTTTTGAAACAGTGCTGTTAAGGC	ociC	60	~2000
CptSc15+	GCCTTAACAGCACTGTTTCAAAAC			
CptSc16-	GTTTGAATATTTGGCATTGATGC			
Microginin				
mgnTe_F61.3	TGGTCAATGGGAGGAGTGATAG	micD, Te	60	514
mgnTe_R60.3	CTGTAGTGATCTCCACTAATCCATTG			
mcnA_F60.5	AAACCCTTTGATTTGAGCCAG	micA, C-Domäne		428
mcnA_R60.3	CAGCAAGGTACAGCCCTGTT			
Aeruginosin				
aerD_F60.7	GAAACCAGTAGTGAACAGACCTTAAATTATC	aerD, choi	60	494
aerD_R61.0	GACCAACTCATCTCAATTTTCCC			
aerBEpi_F54	ACCCGACCCGATCACTTTAAT	aerB, Epi	54	464
aerBEpi_R54	GCCCAATGTTTAAAGGAGCTAGTTT	aerB, Epi	54	464
Anabaenopeptin				
apnDTe_F60.7	GACACGCCTTCTATTTTCGAGA	apnD, Te	60	581
apnDTe_R60.4	CGCGAAATAAAACAATAGGGG			
apnNMT_F55	CGTGCAGATGATGACCTATCCA	apnC, NMT	55	470
apnNMT_R55	AAGGTTTCGAATACTTCAGGGTT			
Microcystin				
mcyCTe_F60.1	TTACAAGCGATGAATCTCATGG	mcyC, Te	60	503
mcyCTe_R60.2	GGGATTTAATAAGAAACCATCAACC			
Peamso_F	ATCAAACAGATGTACTGACAGGT	mcyA, C-Domäne	50	173
Peamso_R	AGGCCAGACTATCCCGTT			
Hep_F	TTTGGGGTTAACTTTTTTGGGCATAGTC	mcyE, AMT	60	466
Hep_R	AATTCTTGAGGCTGTAAATCGGGTTT			
mcyTLi_F59.5 ^c	AAATTGTGCCATTCTCAATTGA	F vor mcyT 5' R in mcyT	66	506
mcyTLi_R60.1 ^c	GGTGGATTAGAAGATTTGAAACCTAA			
Fmcy1_F60.06	ATTTTCCCAAGCATTCTAGG	F in mcyT R in mcyD	60	3213
Fmcy1_F60.90	TCCAATTTCTAGGAAGATTTG			
Fmcy2_F59.72	AGCAGTTAATAATGATGGCG	F in mcyD R in mcyD		3628
Fmcy2_R60.98	GGCTGGGTTCATAATATTAA			
Fmcy3_F60.77	GCCACAGCAGATATTCAAAA	F in mcyD R in mcyD		3417
Fmcy3_R60.90	TTTtagTTAACTCTTGAGAGATTT			
Fmcy4_F60.59	CCAAAAAGGTGAGGATTCTC	F in mcyD R in mcyD		3542
Fmcy4_R60.27	ATCTGTTC AATTCCTTGAGAT			
Fmcy5_F60.06	TTCCGCCAAATTATTACAGA	F in mcyD R in mcyE		3713
Fmcy5_R60.35	ATGGGTAAGGTTTGCTTGAT			
Fmcy6_F60.87	TCTCAATTACAACCTATTGCA	F in mcyE R in mcyE		3596
Fmcy6_R60.35	AATTCGGCTTAAAAAAGCTG			
Fmcy7_F60.35	CAGCTTTTTTAAGCCGAATT	F in mcyE R in mcyE		3573
Fmcy7_R60.60	TTCAAGTATAATTCTCCTTCCTC			
Fmcy8_F60.50	AACTCCATTGACCCAGAGAT	F in mcyE R in mcyG		3663
Fmcy8_R60.95	ATTAAACCCACAATACCGGA			
Fmcy9_F60.94	AATATCGGACATATGCAAATT	F in mcyG R in mcyG		3502
Fmcy9_R60.64	AGTAAATCAGCAATATTTGAGTAA			

Primernam ^a	Sequenz (5' -3')	Genlocus ^b	Tm (°C)	Größe (bp)
Microcystin				
Fmcy10_F60.94	GCGCCGATATTACTCAAAAT	F in <i>mcyG</i> R in <i>mcyA</i>	60	3569
Fmcy10_R60.54	GAATCGGCAAAAAATTAAGC			
Fmcy11_F60.13	GGAGCCTTAAATATAGAAACATC	F in <i>mcyA</i> R in <i>mcyA</i>		3792/5016 ^d
Fmcy11_R60.63	GATTCCAAACAATAGCGACA			
Fmcy12_F60.63	TTTGAATCCAAGTTGAACG	F in <i>mcyA</i> R in <i>mcyB</i>		3368
Fmcy12_R60.43	TTTAAAAGCCCCAAGGTAA			
Fmcy13_F60.15	TATGGGGAAGTTTACAAATT	F in <i>mcyB</i> R in <i>mcyB</i>		3419
Fmcy13_R60.06	TGGCAATATCCAACTCAGAT			
Fmcy14_F60.06	ATCTGAGTTGGATATTGCCA	F in <i>mcyB</i> R in <i>mcyC</i>		3516
Fmcy14_R60.16	TGGATGATTCTTCCAGA			
Fmcy15_F60.90	TTCTCAAGCAGCTTCATATAC	F in <i>mcyC</i> R in <i>mcyJ</i>		3695
Fmcy15_R60.31	AACTCTTCTTGAGCAATTTC			
Fmcy16_F60.34	AAGCTGGAGATCAAGTTTATAG	F in <i>mcyJ</i> R nach <i>mcyJ</i> 3'		3624
Fmcy16_R60.56	TTTGTGTGTCTTGGTTAGGG			
Microviridin				
mvdCD_F61.0	TAGAAGTTAATCCTGGCGGTGA	<i>mvdC</i> + <i>mvdD</i>	61	592
mvdCD_R61.4	GGGCAAATTGTTTGACAGCTT			
mvdL_F60	CGATCGCTGAAATTCTGCTC	F in <i>mvdD</i> R in <i>adpF</i>	60	500-1500
mvdL_R60	CTCCCGAATTCATGCCAATAA			
mvdexE_F59.34 ^c	ATGGACGAAGAAACCTATAAT	F in <i>adpE</i> R im IGS. zw. <i>mvdD</i> + <i>mvdE</i>	59	4700/4200 ^e
mvdexE_R59.32 ^c	GATATGTCAAGGGAAATCCA			
mvdIntmed_F59.94 ^c	TTGATCGAGTCATAGAAGCC	<i>mvdC</i>	60	-
mvdIntmed_R59.94 ^c	GGCTTCTATGACTCGATCAA			
mvdAKO_F61.94 ^c	TATGCAAACCTCAAGTTCCCC	F in <i>mvdA</i> R in <i>mvdB</i>	60	2429
mvdAKO_R60.77 ^c	CTAAGAAGAACGCGATAATTC			
mvdBKO_F61.39 ^c	TGGACAATTTCCCAAGAGAT	F in <i>mvdA</i> R in <i>mvdC</i>	61	2904
mvdBKO_R61.99 ^c	TAGGGAATTAGGGTATCGGC			
mvdCDKO_F59.99 ^c	GGTGATCTTGTTACCAAACG	F in <i>mvdB</i> R im IGS. zw. <i>mvdD</i> + <i>mvdE</i>	60	2667
mvdCDKO_R60.12 ^c	GGATATGTCAAGGGAAATCC			
mvdBdel_F60.4	CATCAATGGGTACTAGAACTTGCA	F in <i>mvdA</i> R in <i>mvdC</i>	60	340
mvdBdel_R60.5	CTTCTATGACTCGATCAATGGTGA			
CmAnf.rev58	ATTATGGTGAAAGTTGGAACCTC	Cm-Kassette	58	-
Planktoeyclin				
acyA_F60.2	CCCTGGAAAAGATATTTTAGGAGC	<i>pagA</i> , N-terminale Protease	60	489
acyA_R60.6	ATTTGAAGTACGGTTTGACATGG			
acyG_F58	TTGCGGCTGATGTTTATGAAAT	<i>pagG</i> , C-terminale Protease	58	500
acyG_R58	CCCGTTCAGGATCAAAAACTT			
Clusterbrücken				
ClbrMvdA_F60.78 ^c	TTATAGGTTTCTTCGTCCATC	F in <i>mvdA</i> R in <i>apnE</i>	60	2080
ClbrApnE_R60.26 ^c	GCCAGCCTTGGTAAGTCTAT			
ClbrApnA_F60.73 ^c	TTAATTCCTCATAGGTCAATTG	F in <i>apnA</i> R in <i>ociD</i>		4700
ClbrCptD_R60.70 ^c	AGCAACTATTCCGTCAGTAGT			
ClbrCptC_R60.42 ^c	TACTTTGCGTTTGTTCATATC	nach <i>ociC</i> 3'		
Clbr2Intermed_F60.20 ^c	CCCAACAATTTGATGTGATT	IGS <i>apnA</i> + <i>ociD</i>		-
Clbr2Intermed_R60.30 ^c	CCATGAATGGCTTCATACAT			

Primername ^a	Sequenz (5´-3´)	Genlocus ^b	Tm (°C)	Größe (bp)
Clusterbrücken				
ClbrInt66.253_F60	TCGTCAAGGCAAGGTAAAAATT	IGS <i>apnA</i> + <i>ociD</i>	60	-
ClbInt2Bispe+60	GAAGATGTTCCCATCACCAAAG			
ClbrInt66.4+60	AGGACAGGTAATGAAAGCAATGA			
ClbrInt253.4+59	GACGTTC TTGGGTAAAGTTACTCAC			
ClbrInt66.5+60	GCATCACTGCGGAAGCTATT			
Genome Walking				
AdaPhuPri59.60 ^c	CCCCTAATACGACTCACTATAG	Adaptor	60	-
AdaPhuPriNes60.50 ^c	ACTCACTATAGGGCTCGAGC	IGS <i>apnA</i> + <i>ociD</i>		
gwCptlGa60.40 ^c	AATGTCCCCAAACATATTCC			
gwCptlGi61.20 ^c	AAACATATTCCCTGCCAAAA			
gwCptlG2a59.90 ^c	TCGTAATACCACATGGTGTG			
gwCptlG2i60.60 ^c	ACATGGTGTGATAGCCGTAG			
gwCptCa60.6	GGATAATGGTTGCTAATTGTT	<i>ociC</i>		
gwCptCi60.6	CTAATTGTTCAATAGTGGGGT	<i>ociD</i>		
gwCptDa59.7	AGATAGGATTAGTTGTCGCTT			
gwCptDi61.1	TGGTGACATTGGAGATAGGA	<i>apnE</i>		
gwApnEa63.50 ^c	TAAAGCCGTCATTGCCAGTA			
gwApnEi60.40 ^c	CATTGCCAGTAATAGACTTACC	unbekannt		
gw257.2apnEa59.80 ^c	AAGATAGAAATGTGCGATCG			
gw257.2apnEi61.30 ^c	CGATCGCCAATCTAATGAG			
gw257.3apnEa60.80 ^c	AGGATGTTTCATTTGACCTTAG			
gw257.3apnEi59.90 ^c	TGACCTTAGCTTAAATTATGAAA			
gw257apnEBr61.70 ^c	TGATAGACCAAGATGTATACGC	Transposase	61	
gw976.2apnEa60.00 ^c	AAACAAAGAAAAATTCACCTC		60	
gw976.2apnEi60.20 ^c	TTCACCTCGGAATCTTTGT		61	
gw976apnEBr61.60 ^c	TTTCACCTCGGAATCTTTGT			
Vektor				
pJET1.2_F60	ACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Klonierungsvektor	60	-
pJET1.2_R60	GAACATCGATTTTCCATGGC			

2.1.4 Marker

Thermo Scientific

Fermentas GeneRuler DNA Ladder Mix
Fermentas GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder
 λ DNA/PstI

2.1.5 Kits

Thermo Scientific

Fermentas GeneJET Plasmid Miniprep Kit

Qiagen GmbH

Qiaquick PCR Purification Kit
Qiaquick Gel Extraction Kit

2.1.6 Geräte

Thermo Scientific

Heraeus Biofuge Fresco
Heraeus Multifuge X3R
Sorvall RC5B Plus

VWR

Digital Heatblock

Memmert

Trockenschrank

BioRad

Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis Systems
GenePulser Xcell Electroporation System
ChemiDoc XRS+
PowerPac 300

Certoclav

Autoclav CV-EL

Parr Instrument Company

4639 Cell Disruption Vessel (45mL)

Heidolph Instruments

Unimax 1010 und Inkubator 1000

Eppendorf

Mastercycler Gradient
Mastercycler nexus gradient

MWG-Biotech

Thermocycler Primus96plus

Peqlab Biotechnologie GmbH

Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer

Millipore

Synergy UV

2.1.7 Medien

BG11 (Rippka 1988)

1000ml Stock-Lösung:

NaNO ₃	8,8ml	17g in 100ml
K ₂ HPO ₄	1ml	3,1g in 100ml
MgSO ₄ *7H ₂ O	1ml	7,4g in 100ml
CaCl ₂ *2 H ₂ O	1ml	3,7g in 100ml
Na ₂ CO ₃	1ml	2,0g in 100ml
Na ₂ MgEDTA	1ml	0,11g in 100ml
Ascorbinsäure	1ml	0,6g in 100ml
FeNH ₃ Citrat	1ml	0,6g in 100ml
A5+Co	1ml	
pH 7,4		
Zugabe von 1,65ml 0,1M HCl		

A5+Co

Spurenelemente	g/L
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ *4 H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	0,222
Na ₂ MoO ₄ *2 H ₂ O	0,39
CuSO ₄ *5 H ₂ O	0,079
Co(NO ₃) ₂ *6 H ₂ O	0,049

2.1.8 Lösungen und Puffer

SDS 20% (Natriumdodecylsulfat)

20g SDS auf 100ml MilliQ Wasser

TES (pH8)

25% w/v Saccharose

24g Saccharose

0,756g TRIS-HCl

2,805g EDTA

96 ml MilliQ Wasser

5Molare NaOH zum Titrieren (ca 4,4ml)

Laufpuffer für Agarosegele 0,5x TBE

1:10 Verdünnung aus 5x TBE:

54g Trisma Base

27,5g Borsäure

20ml 0,5M EDTA (pH8)

Gel Ladepuffer

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylene-cyanol FF

15% Ficoll PM400

auf 50ml mit MilliQ Wasser auffüllen

TES-Lösung

100mM Edta

50mM TRIS-HCL

25% Saccharose

pH8

Natriumacetat (3M, pH7)

12,3g auf 50ml mit MilliQ Wasser auffüllen

Ethanol 70%

36,5ml 99% Ethanol auf 50ml mit MilliQ Wasser auffüllen

TE Puffer (autoklaviert)

10 mM TRIS-HCl

1 mM EDTA

pH 8

LB Medium (autoklaviert)

25g/L Difco LB

auf 1L mit MilliQ Wasser auffüllen

LB Agar (autoklaviert)

25g/L Difco LB

15g/L Bacto Agar

auf 1L mit MilliQ Wasser auffüllen

SOC Medium

20g Bacto Tryptone

5g Bacto Hefeextrakt

0.5g NaCl

mit einer definierten Menge MilliQ Wasser lösen

dann hinzufügen von:

250mM KCl (10ml)

2M MgCl₂ (5ml)

mit MilliQ Wasser auf 980ml auffüllen

autoklavieren und hinzufügen von:

1M sterile Glucose (20ml)

TFB1

12.1g Rubidiumchlorid

9.9g MnCl₂·4H₂O

2.9g Kaliumacetat

1.1g Calciumchlorid

15ml Glycerol

mit MilliQ Wasser lösen und auf 1000ml auffüllen

pH 5.8 einstellen mit HCl

steril filtrieren mit 0.2µm Filter

TFB2

2.1g MOPS

1.2g Rubidiumchlorid

8.3g Calciumchlorid

15ml Glycerol

mit MilliQ Wasser lösen und auf 1000ml auffüllen

pH 6.8 einstellen mit KOH

steril filtrieren mit 0.2µm Filter

Hybridisierungspuffer

50mM TRIS (pH8)

100mM NaCl

1mM EDTA

2.1.9 Software

Chromas 1.45 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>)

Mult Alin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>)

NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Reverse Complement (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)

CAP3 Assembly (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>)

NEBcutter 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2>)

Expasy Translate (<http://web.expasy.org/translate>)

Tm DreamTaq (http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/oligo_melt.html)

Tm Phusion (http://www.finnzymes.com/tm_determination.html)

Eurofins MWG Operon (<http://www.mwg-biotech.com>)

IS Finder (<https://www-is.biotoul.fr>)

Isotopident (http://education.expasy.org/student_projects/isotopident/htdocs)

2.1.10 Biologisches Material

Klonierungsvektor

Rekombinante DNA wurde in dem Vektor pJET1.2 vermehrt.

Cyanobakterienstämme

Bei dem überwiegenden Teil der verwendeten Cyanobakterienisolate handelt es sich um die Gattung *Planktothrix*, im speziellen um die zwei Arten *P. rubescens* und *P. agardhii*. Weitere Gattungen, die untersucht wurden, waren *Oscillatoria* und *Geitlerinema*.

Die Isolate wurden alle aus Laborkulturen des Instituts für Limnologie, Mondsee entnommen, die entweder im Freiland aus unterschiedlichen Seen isoliert oder aus internationalen Kultursammlungen erworben wurden. Die Isolate stammten aus Europa, Asien, Afrika, Nord- und Südamerika.

Die Einteilung der Stämme in Verwandtschaftslinien erfolgte anhand der MLST (Multi Locus Sequence Typing) Methode durch Dr. Rainer Kurmayer (Christiansen et al 2008)

Tab. 2 Auflistung der untersuchten Isolate. Bei den Spezies, wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um *P. rubescens* (rot, Phycoerythrin) und *P. agardhii* (grün, Phycocyanin). Bei dem Toxin handelt es sich immer um Microcystin, außer bei den Isolat PCC6506 und 697, die stattdessen Anatoxin produzieren.
^a inaktiv, *mcy* vorhanden, aber es wird kein MC realisiert; ^b Gattung *Oscillatoria*; ^c Gattung *Geitlerinema*;
^d Art *P. pseudagardhii*

Isolat	Art	Herkunft	Pigmentierung	Toxin
Verwandtschaftslinie 1				
31/1	P. agardhii	Wannsee, DE	grün	ja
32				
39				
41		Jägerteich, AT		nein
63				
66				
79		Lake Arreso, DK		ja
250		Albufera Lagune, ES		nein
251				
252				
253				
254				
255				
256				
257				
259		Wannsee, DE		
274				
281				
299		Klinkenbergerplas, NL		
307				
320				
354		Moose Lake, CA		
394				
554				
759		St. Domingos, PT		
760				
781				
782		St. Domingos, PT		
787				
788				
790		Lake Nero, RU		
828				
829				
836	Lake Nero, RU			
976				
2A				
CCAP1459/15	Ft. Lowell, Tucson, US			
NIVA-CYA126/8	Lake Markusbölefjärden, FI	ja		
PCC7805	Lough Neagh, UK	nein		
PCC7811	Paris, Vert le Petit, FR			
SAG5.81	Kiessee, DE			

Isolat	Art	Herkunft	Pigmentierung	Toxin
Verwandtschaftslinie 1				
SAG6.89	<i>P. agardhii</i>	Plußsee, DE	grün	ja
Verwandtschaftslinie 1A				
277	<i>P. agardhii</i>	Wannsee, DE	grün	nein
364		Moose Lake, CA		
365				
371	rot			
372				
384	grün			
390				
396	rot			
553				
557				
Verwandtschaftslinie 2				
3	<i>P. rubescens</i>	Mondsee, AT	rot	ja
40				inaktiv ^a
64		Wörthersee, AT		ja
80		Schwarzensee, AT		
97		Mondsee, AT		
108		Irrsee, AT		
110		Mondsee, AT		inaktiv ^a
111				ja
139		Grabensee, AT		inaktiv ^a
145				
161				
166				
169				
170				
178				
260	<i>P. agardhii</i>	Wannsee, DE	grün	ja
403	<i>P. rubescens</i>	Moore(Crane)Lake, CA	rot	inaktiv ^a
405				
406				
549				
550				
551				
761		Reservoir Garcia, IT		ja
762				
775		Reservoir Nicolletti, IT		
776				
777				
778				
779				
804	<i>P. agardhii</i>	Winnecook Lake, US	grün	
805				
806				

Isolat	Art	Herkunft	Pigmentierung	Toxin	
Verwandtschaftslinie 2					
807	P. agardhii	Winnecook Lake, US	grün	ja	
808					
814					
815	P. rubescens	China Lake, US	rot		
816					
830					
838					
839					
840					
21-					
496/1		Moore(Crane)Lake, CA		inaktiv ^a	
91/1		Mondsee, AT			
A7		Zürichsee, CH			
CCAP1459/11A	P. agardhii	Windermere, UK	grün	ja	
CCAP1459/14	P. rubescens	Loughrigg Tarn, UK	rot		
CCAP1459/16	P. agardhii	Blelham Tarn, UK	grün		
CCAP1459/17		Esthwaite Water, UK			
CCAP1459/21	P. rubescens	Plöner See, DE	rot		
CCAP1459/31	P. agardhii	White Lough, UK	grün		
CCAP1460/5		Kasumigaura, JP			
PCC7821	P. rubescens	Lake Gjersjoen, NO	rot		
Verwandtschaftslinie 2A					
757	P. agardhii	Lake Hormajärvi, FI	grün		ja
758					
763					
764					
765					
766					
769					
770					
771					
772					
865		Lake Hiidenvesi, FI			
873					
CCAP1459/36				Lake Gjersjoen, NO	inaktiv ^a
Verwandtschaftslinie 3					
704 ^d	P. pseudagardhii	Saka, UG	grün	nein	
707 ^d					
708 ^d					
710 ^d					
711 ^d					
712 ^d					
713 ^d					

Isolat	Art	Herkunft	Pigmentierung	Toxin
Verwandtschaftslinie 4				
67	<i>P. rubescens</i>	Wörthersee, AT	rot	inaktiv ^a
82		Ammersee, DE		ja
83/2				
keiner Verwandtschaftslinie zugeordnet				
PCC9214 ^d	<i>P. pseudagardhii</i>	Central African Republic	grün	nein
916 ^c	<i>Geitlerinema</i>	Crescent Lake, Florida, US		
934 ^c		Saka, UG		
977 ^c		Ft. Lowell, Tucson, US		
978 ^c				
979 ^c				
980 ^d	<i>P. pseudagardhii</i>			
981 ^c	<i>Geitlerinema</i>	Furnas Reservoir, Minas Gerais, BR		
982 ^c				
Furnas 2 ^c				
Daniel 1 ^c				
PCC6506 ^b	<i>Oscillatoria</i>	unknown		Anatoxin
697 ^b		Teich, Mistelbach, AT		
NIES204	<i>P. agardhii</i>	Kasumigaura, JP		ja

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Cyanobakterienisolate

Für die Betreuung aller Cyanobakterienisolate war Labortechnikerin Anneliese Wiedlroither verantwortlich. Die Isolate wurden in Form einer batch-Kultur in BG-11 Medium (Rippka 1988) je nach Herkunft bei Temperaturen von 15°C, 20°C und 28°C in 40 ml Nunclon Zellkulturflaschen kultiviert. Wobei die Kulturflaschen nur mit 30 ml Medium gefüllt waren. Die Lichtintensität betrug ca. $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ für 16-19h pro Tag. Es wurden ca. 5 ml von der alten Kultur alle 49 Tage wieder neu in BG11 Medium überimpft. Zusätzlich wurden alle Kulturen einmal die Woche geschüttelt.

2.2.2 Isolation von Nukleinsäuren

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Schritte mit der Heraeus Biofuge Fresco (Tischzentrifuge) bei Raumtemperatur (RT) und 13k rpm Zentrifugationsgeschwindigkeit ausgeführt.

Damit man die Zellen durch Pelletieren ernten konnte, musste man die Gasvesikel von *Planktothrix* zerstören. Es wurden hierfür drei verschiedene Methoden angewendet:

Die Kulturen wurden vor der Isolation bei -20°C eingefroren oder umgefüllt in 50 ml Falcon Röhrchen und mit einem schweren Gegenstand wie z.B. einer Glasflasche geklopft, bis feine Haarrisse in den Falcon Röhrchen zu sehen waren. Die dritte Methode bestand darin die Zellen durch das Parr Gerät mit ca. 1000 psi (68 bar) hohem Druck zu zerstören. Der nächste Schritt war das Abzentrifugieren der Zellen mit der Sorvall RC5B Plus im SS-34 Rotor für 10 min bei 9500 rpm (9000g).

Der Überstand wurde weggeleert und das Pellet drei mal mit TE Puffer gewaschen. Nach dem 3. Waschvorgang wurde das Pellet in 1ml TES Lösung aufgenommen. Dann wurde eine Spatelspitze Lysozym hinzugegeben und für mind. 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1/10 des Volumen (100 μl) an 20% igen SDS (Endkonz. 2 %) und 5 μl Proteinase K zugegeben (bei 65°C für 2h oder über Nacht inkubieren). Wichtig war es, dass der Ansatz zwischendurch immer wieder gevortext wurde. Bei erfolgreichem Abbau der Proteine färbte sich die Lösung gelblich-braun.

Dann wurde gleiches Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzugegeben und für 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal ausgeführt. Dabei wurde vorsichtig jeweils die obere wässrige Phase abgenommen, in der sich die DNA befand, ohne die weiße Schicht (Debris) der Interphase mitzunehmen. Das Phenol wurde anschließend durch einen Schritt mit Chloroform/Isoamylalkohol entfernt. Dabei wurde wieder 10 min zentrifugiert und die wässrige Phase abgenommen.

Zur Fällung der DNA wurde 1/10 des Volumens an Natriumacetat und 0.7 mal das Volumen an Isopropanol hinzugegeben. Das Eppi wurde einige Male invertiert. Dabei sollten Blasen aufsteigen und die DNA sichtbar ausfallen.

Bei Kulturen mit hoher Viskosität (viele Polysaccharide) wurde statt Natriumacetat PEG 4000 eingesetzt. Dazu wurde die Hälfte des Volumens an PEG 4000 und 0.7 mal das Volumen an

Isopropanol hinzugegeben. Die DNA wurde 30 min bei RT gefällt und danach 20 min bei 4°C zentrifugiert. Danach sollte je nach DNA Menge ein Pellet zu sehen sein. Der Überstand wurde wegleert.

Am Schluss folgten noch zwei Waschschrte mit 70% igen Ethanol. Dazwischen wurde das Pellet durch Vortexen gelöst und der Überstand verworfen.

Das Pellet musste getrocknet werden, damit keine Ethanol Reste übrig bleiben. Danach wurde das Pellet in 100 µl Wasser oder TE-Puffer aufgenommen. Zur Bestimmung der DNA Menge wurde die Absorption der Probe im Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer bei 260 nm gemessen.

2.2.3 PCR Protokolle und Master Mixe

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene DNA Polymerasen eingesetzt. Erstens, die robuste und thermostabile DreamTaq DNA Polymerase, die für kleinere DNA Fragmente bis zu 6 kb verwendet wurde. Die DreamTaq hat keine proof-reading Funktion und erzeugt am 3' Ende A-Überhänge.

Weiters wurde die ebenfalls thermostabile, aber wesentlich prozessivere und genauere Phusion DNA Polymerase verwendet. Die Phusion DNA Polymerase hat eine sehr niedrige Fehlerrate und erzeugt blunt-end Amplicons, die für die Klonierung im Vektor pJET1.2 (blunt-end Klonierung) eingesetzt werden können.

Die PCR Protokolle und Master Mixe für die DreamTaq und Phusion DNA Polymerase sind in den folgenden Tabellen (Tab. 3, Tab. 4, Tab. 5 und Tab. 6) aufgelistet, wobei die Temperatur (T_m) des Annealings je nach der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide variierte. Die Elongationszeit hing von der Größe des jeweiligen PCR-Produktes und der verwendeten Polymerase ab. Die angeführten Elongationszeiten beziehen sich auf die Angaben der Hersteller unter Idealbedingungen.

Die Konzentration der Template-DNA wurde für die PCR auf 50 ng/µl eingestellt.

Tab. 3 PCR Protokoll für DreamTaq DNA Polymerase. Die Annealing-Temperatur der jeweiligen Primer wurde nach Breslauer et al (1986) berechnet.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholung
Anfangsdenaturation	94°C	3 min	1
Denaturation	94°C	30 sec	35
Annealing	variabel	30 sec	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Finale Elongation	72°C	1 min/kb	1

Tab. 4 PCR Master Mix für DreamTaq DNA Polymerase (50 µl)

Komponente	Reaktionsvolumen	Endkonzentration
10x DreamTaq Puffer	5 µl	1x
25 mM MgCl ₂	2 µl	1 mM + 2 mM buffer
dNTP Set 10 mM	1.5 µl	0.3 mM
Primer Fwd 10 µM	1.5 µl	0.3 µM
Primer Rev 10 µM	1.5 µl	0.3 µM
DreamTaq 5U/µl	0.25 µl	1.25U
DNA	1 µl	variabel
MilliQ	37.25 µl	

Tab. 5 PCR Protokoll für Phusion DNA Polymerase. Die Annealing-Temperatur der jeweiligen Primer wurde nach Breslauer et al (1986) berechnet.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholung
Anfangsdenaturation	98°C	1 min	1
Denaturation	98°C	10 sec	
Annealing	variabel	10 sec	40
Elongation	72°C	15 sec/kb	
Finale Elongation	72°C	15 sec/kb	1

Tab. 6 PCR Master Mix für Phusion DNA Polymerase (50 µl)

Komponente	Reaktionsvolumen	Endkonzentration
5x Phusion HF Puffer	10 µl	1x (1.5 mM MgCl ₂)
dNTP Set 10 mM	1 µl	0.2 mM
Primer Fwd 10 µM	2.5 µl	0.5 µM
Primer Rev 10 µM	2.5 µl	0.5 µM
Phusion 2U/µl	0.5 µl	1U
DNA	1 µl	variabel
MilliQ	32.5 µl	

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese nach der Standardmethode von Sambrook *et al.*, (1989) aufgetrennt und durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Gelelektrophorese ermöglicht die genaue Auftrennung der DNA anhand der Molekülgröße. Die DNA ist aufgrund der Phosphatreste negativ geladen und wandert im elektrischen Feld zum positiven Pol, wobei kleine DNA Moleküle immer schneller wandern als große.

Je nach Größe der DNA-Fragmente wurde ein 0,8-2,0% iges (w/v) Agarosegel verwendet. Dazu wurde die benötigte Agarose Menge in 0.5x TBE durch Erhitzen gelöst und direkt in die Agaroselösung wurde 1µl Ethidiumbromid pro 100 ml hinzugegeben. Die Laufspannung betrug je nach Größe des Gels 90 – 140V. Nach der Auftrennung der Banden auf dem Agarosegel wurde dieses unter UV-Licht in der Geldokumentation fotografiert. Zur Bestimmung der Größe der sichtbaren Banden wurde ein passender Marker verwendet.

2.2.5 Herstellung von λ/PstI Marker

Für die Herstellung von 1 ml λ/PstI Marker wurden 100 µl 10x FastDigest Green Puffer, 300 µl λDNA (0.3 µg/µl), 9 µl PstI Restriktionsenzym und 591 µl MilliQ bei 37° C über Nacht inkubiert.

Anschließend wurden davon Aliquots à 100 µl hergestellt.

2.2.6 Klonierung

Die Klonierung ist eine Methode zur identischen Vervielfältigung von DNA Fragmenten.

Die jeweiligen linearen DNA Sequenzen wurden in einen bakteriellen Vektor (pJet1.2) ligiert und zur Vervielfältigung in den kompetenten *E.coli* Stamm Dh5α transformiert. Bedingt durch das klonale Wachstum von *E. coli* werden hierbei millionenfache gleiche DNA-Kopien produziert.

Das Klonieren war bei einigen unspezifischen und schwachen PCR-Produkten notwendig, um die Qualität der Sequenzierungen zu verbessern.

2.2.7 Ligation & Transformation

Für die blunt-end Ligation eines DNA Fragments (Insert) in den pJET1.2 Vektor wurde ein Insert-DNA zu Vektor-DNA Verhältnis von 3:1 (auf Molekülbasis) verwendet. Wenn nötig, wurde der Ligationsansatz mit MilliQ Wasser auf 10 µl ergänzt, da der Anteil der Insert-DNA je nach Konzentration variierte (Tab. 7).

Tab. 7 Ligationsansatz

Komponente	Reaktionsvolumen
pJET1.2 (50 ng)	1 µl
PEG 4000	1 µl
10x T4 DNA Ligase Puffer	1 µl
T4 DNA Ligase (5U/µl)	1 µl
Insert-DNA	variabel (max. 6 µl)
MilliQ	auf 10 µl ergänzen

Der Ligationsansatz wurde für eine Stunde bei 16°C inkubiert. Die aliquotierten 100 µl kompetenten Zellen (Dh5α) wurden auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz gemischt und für mindestens 20 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock, über eine Minute bei 42°C, wurde die Probe auf Eis abgekühlt (1 min). Anschließend erfolgte die Zugabe von 650 µl SOC-Medium und eine Inkubation bei 37°C im Schüttelheizblock für 45 min (Amp) oder für 90 min (Cm).

Danach wurden die Zellen kurz anzentrifugiert bei 13k rpm und das Zellpellet wurde auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotika ausplattiert (37°C, über Nacht).

2.2.8 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die chemisch kompetenten Zellen wurden gemäß dem Protokoll des Qiagen Bench Guide hergestellt. Für die Klonierung wurde der *E.coli* Stamm Dh5α (K12) verwendet.

2.2.9 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

RE wurden zur Spaltung von genomischer DNA, Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten nach einer PCR verwendet. Diese schneiden an spezifischen, meist 4 – 8 Basenpaaren langen Erkennungssequenzen. Es wurden RE der Firmen Thermo Scientific Fermentas und New England Biolabs verwendet. Der Verdau mit RE erfolgte nach Angaben des Herstellers in den mitgelieferten konventionellen Fermentas 10x Restriktionspuffern (5-color), Fermentas 10x FastDigest Green Puffer oder 10x NEBuffer 1-4 (Endkonz. 1x). Die RE wurden mindestens 1:10 im Ansatz verdünnt, damit der Glycerolgehalt die 5% nicht überschreitet und dadurch Star-Aktivität begünstigt werden könnte. Die Spaltung von DNA diente sowohl dem diagnostischen Zweck um einzelne PCR Produkte zu unterscheiden, als auch zur Präparation der PCR Produkte für die weitere Verwendung.

2.2.10 Mutagenese

Einleitung

Es wurde gezielt versucht, einzelne Gene des Microviridin Genclusters mittels rekombinanter DNA auszuschalten. Das Konstrukt der rekombinanten DNA setzt sich aus dem Klonierungsvektor pJET1.2 und dem jeweiligen Gen, das durch eine Cm-Kassette unterbrochen ist, zusammen. Die Rekombination hat zur Folge, dass dieses Gen „außer Gefecht“ gesetzt wird, man spricht auch von einem Gen-Knockout. Die Cm-Kassette dient zugleich auch als Selektionsmarker, da nur jene Cyanobakterien Zellen unter Cm-Druck überleben können, die das Knockout Gen ins Genom aufgenommen haben. Die Cm-Kassette wurde aus dem Vektor pACYC184 mit den RE BsaAI und BsaBI ausgeschnitten und von Dr. Guntram Christiansen zur Verfügung gestellt.

Die Integration ins Genom passiert durch homologe Rekombination (HR), wobei durch zweifachen „crossing over“ homologe DNA-Abschnitte ausgetauscht werden können. Die ideale Größe der homologen Bereiche wäre 1.5 kb auf beiden Seiten (laut persönliche Mitteilung von Guntram Christiansen). HR ist ein Werkzeug der Zelle, um Genmutationen zu reparieren.

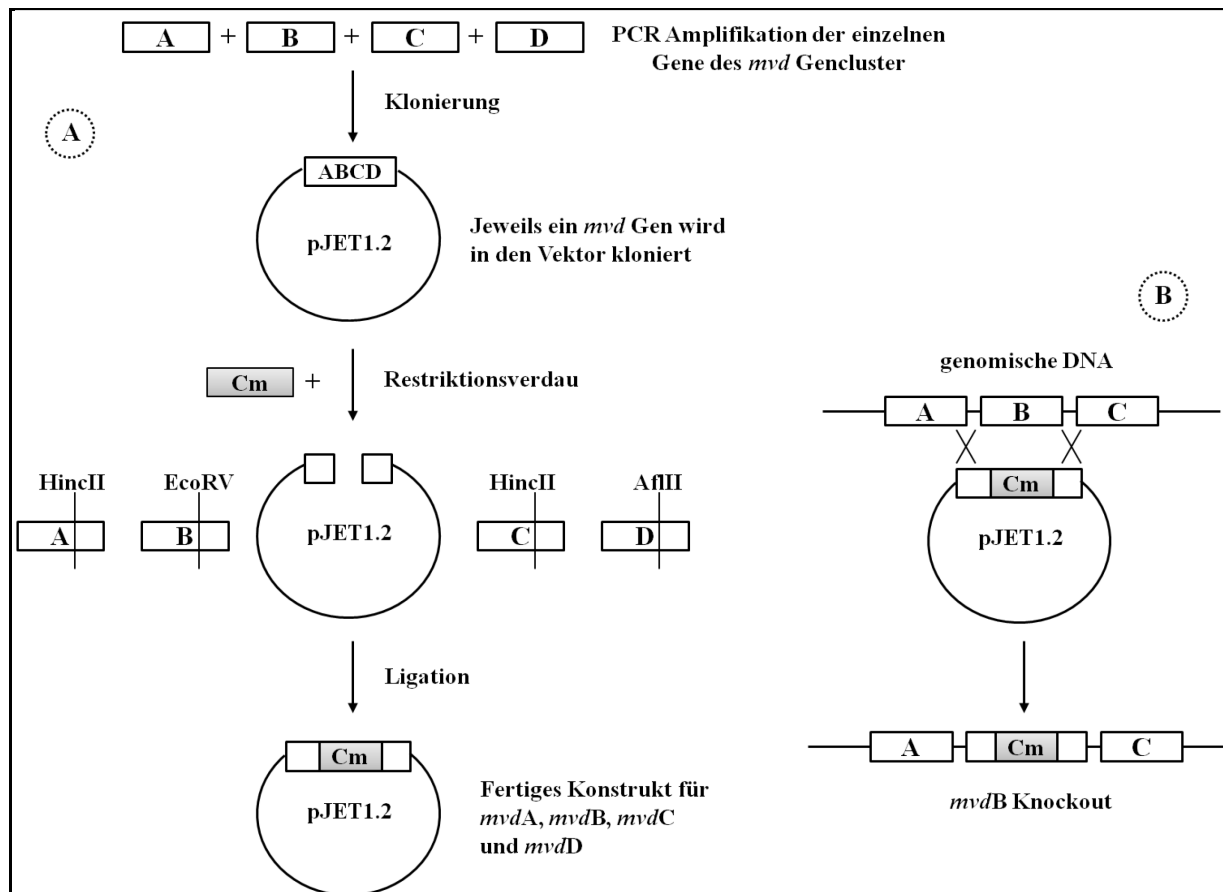


Abb. 19 Konstrukt Herstellung und homologe Rekombination. (A) Graphische Darstellung der Konstruktherstellung für alle vier *mvd* Gene, (B) Exemplarische Darstellung der homologen Rekombination für *mvdB*

Durchführung

Zu Beginn wurden die einzelnen *mvd* Gene aus dem Genom amplifiziert, wobei zusätzlich noch für jedes Gen angrenzende Sequenzabschnitte mitamplifiziert wurden, die für die homologe Rekombination notwendig sind. Es wurde das Phusion Protokoll (Tab. 5) verwendet (60°C Annealing, 45sec Elongationszeit). Für *mvdA* wurden die *mvdAKO* Primer, für *mvdB* die *mvdBKO* Primer und für *mvdC* + *mvdD* die *mvdCDKO* Primer verwendet (Tab. 1). Das PCR Produkt wurde mit dem Qiaquick PCR Purification Kit aufgereinigt und jedes einzelne Amplifikat wurde dann in den Vektor pJET kloniert (Kap. 2.2.7 Ligation & Transformation).

Anschließend wurden die Gene mit den RE geschnitten (Abb. 19), um die Cm-Kassette einzubringen. Es wurden jeweils 3 µg DNA für den Verdau eingesetzt mit 3 µl Enzym pro Ansatz. Als Puffer wurde der Fermentas 10x FastDigest Green verwendet. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert.

Da, dass RE AflIII, mit dem das *mvdD* Gen geschnitten wurde, „sticky-ends“ macht kann es nicht direkt für die blunt-end Ligation verwendet werden. Daher wurden die 5'Überhänge mit dem Fermentas Klenow Fragment Enzym aufgefüllt. Diese Reaktion wurde direkt in dem Verdauansatz mit dem gleichen Puffer ausgeführt, 2mM dNTPs und 1µl Klenow Fragment (10 U/µl). Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 20 min und Aufreinigung über Qiaquick PCR Purification Kit.

Dann erfolgte die Ligation der Cm-Kassette in den geschnittenen Vektor. Zur Überprüfung ob das Konstrukt richtig „zusammengebaut“ wurde, wurde es mit dem CmAnf.rev Primer sequenziert. Mit diesem Primer sequenzierte man aus der Cm-Kassette hinaus, wobei man auch die Sequenz der jeweiligen *mvd* Gene erhielt. Alle folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen vorgenommen.

Für die Transformation von *Planktothrix* wurde der Stamm *P. agardhii* NIVA-CYA 126/8 verwendet, der in der Vergangenheit bereits zum wiederholten Male erfolgreich transformiert wurde (Christiansen et al 2003). Die Zellen vom Isolat NIVA-CYA 126/8 wurden hierfür in 50 ml Falcon Röhrchen aufgeteilt. Für die Zentrifugation der Zellen war es zuerst notwendig, die Gasvesikel durch Druck zu zerstören. Dafür wurden die Zellen mit einem schweren Gegenstand wie z.B. einer Glasflasche geklopft, bis feine Haarrisse in den Falcon Röhrchen sichtbar waren. Gleichzeitig war zu beachten, dass diese nicht brechen.

Als nächstes wurden die Zellen 10min (4800g, 16°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und in einem sterilen Erlenmeyerkolben gesammelt. Das Pellet wurde in 10 ml HEPES Puffer gelöst und wieder für 10 min (4800g 16°C) abzentrifugiert, um Salzreste loszuwerden. Der Überstand wurde weggeleert. Dies wurde drei mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet nur mehr in ganz wenig HEPES, vielleicht 500 µl gelöst und auf Eis gestellt.

Die fertigen Konstrukte wurden bei 95°C für 10 min auf dem Heizblock erhitzt, um diese einzelsträngig zu machen. Zur Abkühlung wurden diese sofort auf Eis inkubiert, kurz anzentrifugiert und wieder auf Eis inkubiert.

In einen sterilen 250 ml Erlenmeyerkolben wurden jeweils 25 ml neues BG11 Medium und 25 ml altes Zellenmedium, das zuvor gesammelt wurde, gemischt.

Beim nächsten Schritt wurden 100 µl der Konstrukte mit 100 µl der pelletierten Cyanobakterienzellen zusammenpipettiert und vorsichtig mit der Pipette vermengt. Dieses Gemisch wurde in eine neue sterile bei -20°C vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Da das Zellen-Konstrukt Gemisch sehr dickflüssig war, musste man die Küvette vorsichtig klopfen, damit das gesamte Gemisch am Boden der Küvette zu liegen kam.

Die Küvette wurde anschließend rasch in den Elektroporator gestellt und Spannung mit folgenden Einstellungen angelegt: 1000 V, 25 µF und 200 Ω. Sofort nach der Elektroporation wurde 1 ml des zuvor vorbereiteten Mediums direkt in die Küvette hinzugegeben, um somit die Zellen leichter und vorallem komplett aus der Küvette zu bekommen. Diese gesamte Lösung wurde wieder zurück in den 250 ml Erlenmeyerkolben mit dem BG11 Medium pipettiert.

Nach 48 Stunden wurde zur Selektion 1µl des Antibiotikums Chloramphenicol (Endkonzentration: 1µg/ml) hinzugegeben. Es sollten nur jene Zellen überleben, die das Konstrukt mit der AB-Resistenzkassette durch homologe Rekombination ins Genom aufgenommen haben.

2.2.11 Genome Walking

Einleitung

Das Genome Walking (GW) wurde nach der Methode von Siebert et al (1995) durchgeführt und ist eine Methode um neue unbekannte DNA-Sequenzabschnitte im Genom zu amplifizieren.

Es ist nur ein kleiner bekannter Bereich notwendig, groß genug für einen genspezifischen Primer (GSP), der als sogenannter „Anker“ dient. Ausgehend von diesem Startpunkt wandert man schrittweise 5' oder 3' der DNA entlang. Für eine erfolgreiche PCR benötigt man auf der anderen Seite noch eine weitere Primer-Bindestelle, die durch den Adapter gegeben ist. An diesen Adapter, welcher an die Enden der DNA Fragmente ligiert wird, bindet der spezielle Adapterprimer (AP).

Zur Erhöhung der Ausbeute und Spezifität wurde zusätzlich jeweils noch ein zweiter PCR Lauf mit einem nested AP und nested GSP durchgeführt. Die nested Primer haben teilweise die gleiche Erkennungssequenz und überlappen die ersten Primer (Abb. 20).

Um einzelne spezifisch geschnittene DNA Fragmente zu bekommen wurde die isolierte DNA mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut (Abb. 21).

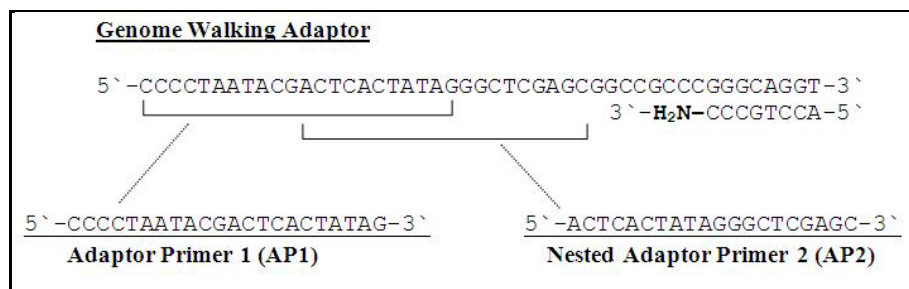


Abb. 20 Struktur des Adaptors und der Adapter Primer

Dieser Adaptor wird an beiden Enden jedes DNA-Fragments ligiert. Für die Spezifität des GW trägt der kurze Adaptor-Strang am 3' Ende eine Amino Gruppe, wodurch verhindert werden soll, dass dieser durch die Polymerase aufgefüllt wird. Ohne dieser Blockierung würden AP1 und AP2 an jedem Adaptor binden und unspezifische DNA-Fragmente amplifizieren. Nur aufgrund der Bindung eines GSP, durch den das gewünschte DNA-Fragment mit dem daran ligierten Adapter amplifiziert wird, können die dazu komplementären AP1 und AP2 binden.

Durchführung

Der erste Schritt beim GW war ein Restriktionsverdau von ca. 4 µg DNA je Stamm. Das Volumen beim Verdauansatz war 50 µl. Die eingesetzte DNA wurde je nach Konzentration auf ca. 4µg eingestellt. Als Puffer wurde je Ansatz 5 µl des Fermentas 10x FastDigest Green und 3 µl der jeweiligen Restriktionsendonuklease EcoRV, DraI oder PacI pro Ansatz eingesetzt. Der Rest wurde mit MilliQ Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Der Verdau wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Aufreinigung des Verdaus erfolgte mit dem Qiaquick PCR Purification Kit, eluiert wurde mit 50 µl. Zur Bestimmung der DNA Konzentration wurden die Proben mit dem Nanodrop ND-1000 gemessen.

Bei den weiteren Schritten wie Ligation, Aufreinigung und Verdünnung ist darauf zu achten, dass am Ende für den primären PCR Lauf mit den äußeren AP1 und GSP1 eine DNA Konzentration von ca. 2.5 ng/µl eingesetzt werden sollte.

Für die Hybridisierung der Adaptoren wurden diese in einem Hybridisierungspuffer bei 95°C für ca. 10 min inkubiert und zur gegenseitigen Wiederanlagerung der Adaptoren wurden sie langsam abgekühlt.

Weiters wurde nur für die Ansätze mit dem RE PacI ein Endrepair (Überhänge werden wegverdaut) gemacht, da es nicht blunt schneidet, sondern 3' Überhänge produziert. Dies wurde mit der Fermentas T4 DNA Polymerase und dem passenden Fermentas 5x T4 DNA Polymerase Puffer gemacht. Der Ansatz wurde bei 11°C für 20 min inkubiert. Danach wieder Aufreinigung mit dem Qiaquick PCR Purification Kit und Bestimmung der DNA Menge.

Beim nächsten Schritt wurden die Adaptoren an die DNA-Fragmente ligiert. Das Verhältnis eingesetzter DNA Menge zu Adaptoren sollte ca. 500:1 sein (z.B. bei 500 ng DNA werden 1 µl Adaptoren eingesetzt). Für die Ligation wurden 2 µl Fermentas T4 DNA Ligase (5 U/µl) und Fermentas 10x T4 DNA Ligase Puffer (Endkonz. 1x) eingesetzt. Zusätzlich wurde noch für eine höhere Effizienz der Ligation Fermentas PEG 4000 (1:10) hinzugegeben. Der Ansatz wurde bei 16°C für 2h inkubiert. Danach folgte wieder eine Aufreinigung mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kit und eine Nanodrop Messung.

Nun muss die DNA dementsprechend mit MilliQ Wasser verdünnt werden, dass bei der primären PCR eine Konzentration von ca. 2.5 ng/µl eingesetzt werden kann. Für die primäre PCR (10 µl Ansatz) mit den AP1 und GSP1 wurde die Fermentas Phusion High Fidelity DNA Polymerase (2 U/µl) und der Fermentas 5x Phusion HF Puffer verwendet (Tab. 5, Tab. 6). Die Annealing Temperatur betrug immer 60°C und die Elongationszeit variierte zwischen 30sec. - 2min.

Dieses PCR Produkt wurde 1:10 mit MilliQ Wasser verdünnt. Davon wurde dann 1 µl als Template DNA für die sekundäre PCR mit den nested AP2 und nested GSP2 verwendet.

Für die sekundäre PCR (10 µl Ansatz) wurde das gleiche Protokoll verwendet. Die kompletten 10 µl PCR Ansatz wurden zur Überprüfung auf ein Agarose Gel aufgetragen und falls prominente Banden zu sehen waren, wurde die sekundäre PCR mit einem 30 µl Ansatz wiederholt.

Das PCR Produkt wurde wieder komplett aufs Gel aufgetragen und die Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit aufgereinigt. Zur Ermittlung der DNA Konzentration wurde die Probe mit dem Nanodrop ND-1000 gemessen.

Diese ausgeschnittenen DNA Fragmente wurden mit Hilfe des Vektors pJET1.2 kloniert und zur Sequenzierung an die Firma MWG-Biotech geschickt.

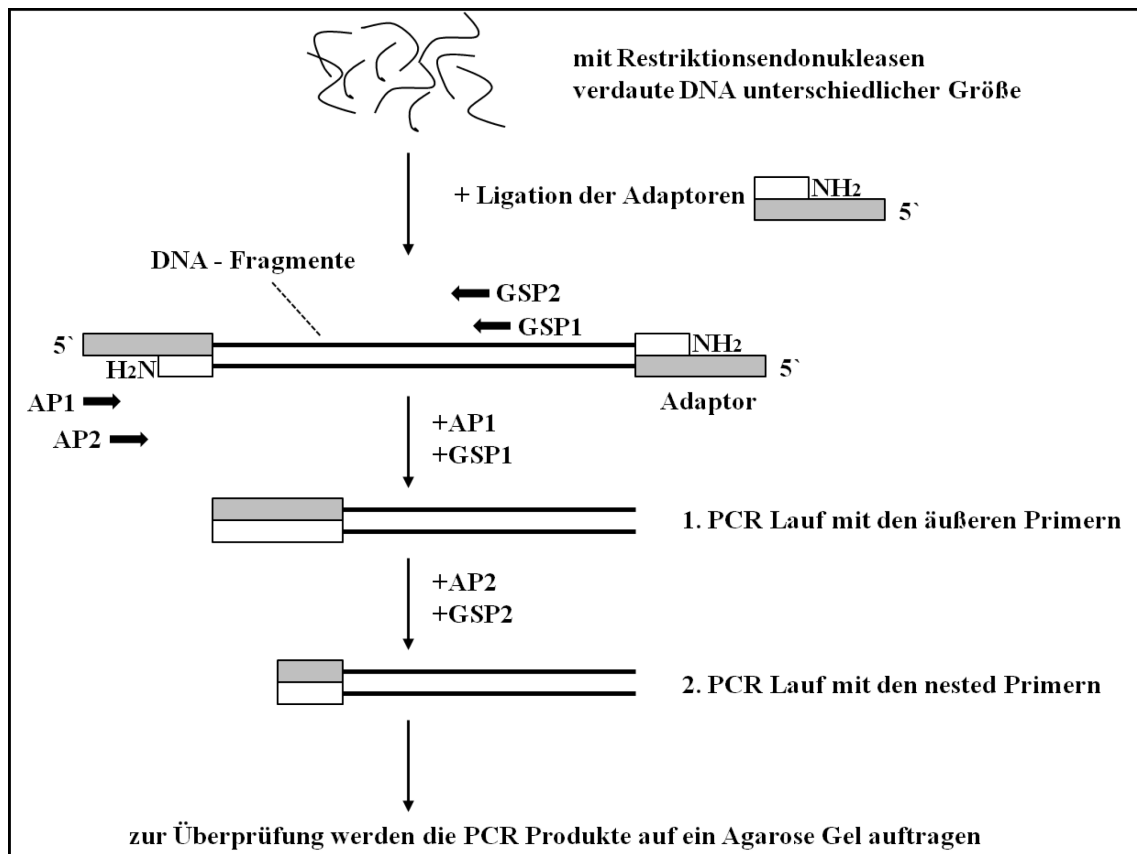


Abb. 21 Überblick der Schritte des Genome Walking

Zur weiteren Erhöhung der Spezifität kommt der „suppression PCR“ Effekt zur Anwendung, bei dem die Amplifikation von unspezifischen DNA-Fragmenten durch Ausbildung einer „panhandle“ Struktur fast zur Gänze unterdrückt werden kann.

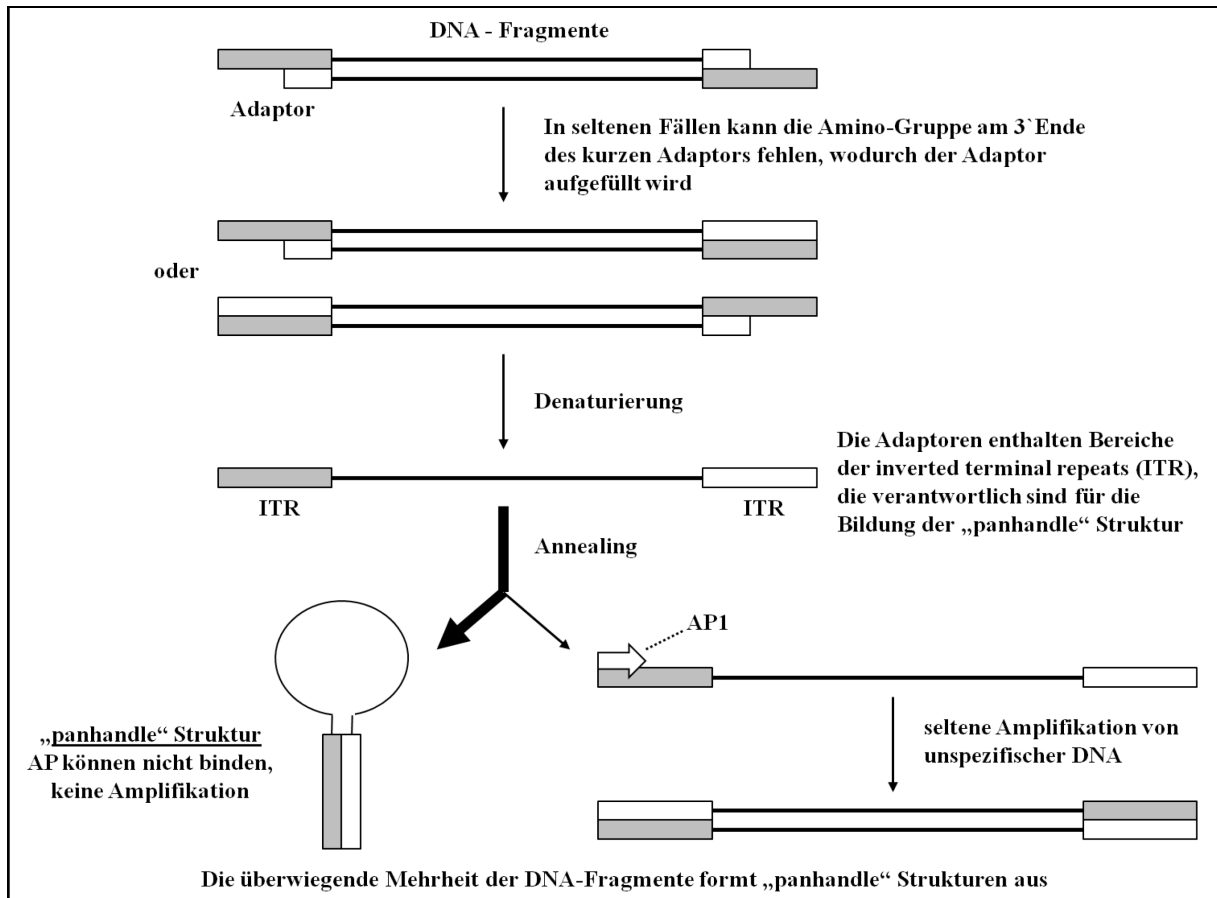


Abb. 22 Der „suppression PCR“ Effekt

Durch die Bindung des GSP wird verhindert, dass sich eine „panhandle“ Struktur ausbildet, da keine komplementäre zweite Adaptorsequenz amplifiziert wird. (Abb. 21)

3 Ergebnisse

3.1 Präsenz und Absenz der Peptid(synthetase) – Gencluster

Es wurden hier nicht alle Gelbilder der einzelnen Peptid Gencluster hinzugefügt, da dies den Rahmen sprengen würde. Es wurden nur gut sichtbare spezifische Gelbanden in der richtigen Größe als positives PCR Resultat gewertet. Schwache Banden wurden mehrmals getestet, mit einem weiteren Primerpaar wiederholt oder die PCR wurde mit erniedrigter Primer Annealingtemperatur versucht. Die PCR wurde mit der DreamTaq DNA Polymerase durchgeführt und zur Überprüfung wurden die Produkte auf ein 0.8% iges Agarosegel aufgetragen.

Tab. 8 zeigt eine detaillierte Auflistung welcher Stamm welche Gencluster besitzt. Bei den teilweise stark sichtbaren sehr kurzen Fragmenten handelte es sich um Primerdimere.

3.1.1 Gencluster der Aeruginosinsynthetase (*aer*)

Es wurden zwei Primerpaare für das Screening verwendet. Das erste Primerpaar amplifizierte fast das komplette *aerD* Gen, welches für die Aktivierung der charakteristischen Gruppe 2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole (Choi) mitverantwortlich ist, das resultierende Amplicon war 493 bp (Abb. 23, Nr. 1a). Das zweite Primerpaar amplifizierte die Epimerisationsdomäne in *aerB* mit einem Amplicon von 464 bp (Abb. 23, Nr. 1b). Beide PCRs ergaben sehr spezifische Ergebnisse ohne Nebenbanden. Die PCRs mussten nicht wiederholt werden. Alle Isolate von *P. agardhii* und *P. rubescens* waren positiv. Nur bei den restlichen 20 Isolaten von *P. pseudagardhii*, *Geitlerinema* und *Oscillatoria* wurde kein Aeruginosin Gencluster nachgewiesen. Insgesamt waren es 122 von möglichen 142 Isolaten.

3.1.2 Gencluster der Anabaenopeptinsynthetase (*apn*)

Es wurden zwei Primerpaare für das Screening verwendet. Das erste Primerpaar amplifizierte die Thioesterase (TE) Domäne in *apnD* mit einem Amplicon von 581 bp (Abb. 23, Nr. 2a) und das zweite Primerpaar die N-Methyltransferase Domäne (NMT) in *apnC* (470 bp, Abb. 23, Nr. 2b). Es waren einige schwache Banden und auch teilweise leichte Seitenbanden zu sehen. Um sicherzugehen wurden die PCR für einige Isolate mit erniedrigter Annealingtemperatur wiederholt. Es waren nicht alle Isolate von *P. agardhii* und *P. rubescens* positiv. Bei 15 Isolaten konnte der Anabaenopeptin Gencluster nicht nachgewiesen werden. Insgesamt waren es nur 107 von 142 Isolaten.

3.1.3 Gencluster der Cyanopeptolinsynthetase (*oci*)

Es wurden drei Primerpaare für das Screening verwendet. Das erste Primerpaar amplifizierte die Thioesterase (TE) Domäne in *ociC* mit einem Amplicon von 690 bp (Abb. 23, Nr. 3a) und das zweite Primerpaar die vierte Adenylierungsdomäne (A4-Domäne, Ahp) in *ociB* mit einem Amplicon von 512 bp (Abb. 23, Nr. 3b) und das dritte Primerpaar die A2-Domäne in *ociA* (416 bp). Das Gelbild dieser dritten PCR wurde nicht eingefügt. Die PCR der TE Domäne ergab sehr spezifische Banden, jedoch

die PCR mit dem 2. Primerpaar gestaltete sich etwas schwieriger, weil bei wenigen Isolaten Doppelbanden zu sehen waren. Daher wurde ein drittes Primerpaar verwendet, um sicher zu gehen, dass diese Resultate spezifisch sind. Generell wurde das Cyanopeptolin am häufigsten gefunden: von 142 Isolaten waren 126 positiv.

3.1.4 Gencluster der Microgininsynthetase (*mic*)

Es wurden zwei Primerpaare für das Screening verwendet. Das erste Primerpaar amplifizierte die Thioesterase (TE) Domäne in *micD* (514 bp). Das Gelbild für diese PCR wurde nicht hinzugefügt. Das zweite Primerpaar amplifizierte die zweiten Kondensationsdomäne (C2-Domäne) in *micA*. Das resultierende Amplicon war 428 bp (Abb. 23, Nr. 4). Im Vergleich zu den anderen Pepiden war Microginin wesentlich seltener. Nur bei 11 Isolate der Gattung *Planktothrix* konnte der Microginin Gencluster nachgewiesen werden.

3.1.5 Gencluster der Microcystinsynthetase (*mcy*)

Es wurden drei Primerpaare für das Screening verwendet. Das erste Primerpaar amplifizierte die Thioesterase (TE) Domäne in *mcyD* mit einem Amplicon von 503 bp (Abb. 23, Nr. 5a), das zweite Primerpaar die C-Domäne in *mcyA* mit einem Amplicon von 173 bp (Abb. 23, Nr. 5b) und das dritte Primerpaar die Aminotransferase Domäne (AMT) in *mcyE* (466 bp). Das Gelbild für die PCR mit den dritten Primern wurde nicht hinzugefügt. Da man schon LC/MS Daten sämtlicher Isolate vorliegen hatte, wusste man schon welcher Stamm Microcystin realisiert. Die PCR mit den TE Primern ergab nur wenige positive Resultate. Am meisten Isolate konnte man mit dem zweiten Primerpaar (kleines Amplicon) nachweisen. Die restlichen negativen Isolate konnten mit dem Primer in der AMT Domäne bestätigt werden. Insgesamt waren von 142 Isolaten 76 für den Microcystingencluster positiv.

3.1.6 Microviridin Gencluster (*mvd*)

Es wurden zwei Primerpaare für das Screening verwendet. Das erste Primerpaar überbrückte den intergenischen Bereich zwischen *mvdC* (forward Primer) und *mvdD* (reverse Primer). Das resultierende Amplicon war 592 bp (Abb. 23, Nr. 6a). Die zweite Primer Kombination teilte den gesamten Gencluster in zwei Hälften, wobei der intermediate Primer in *mvdC* (Intermed_F oder Intermed_R), einmal als forward und das andere Mal als reverse Primer fungierte. Der Intermed_R Primer wurde mit dem Primer in *adpE* (*mvdexE_F*) kombiniert. Der Intermed_F Primer wurde mit dem *mvdexE_R* Primer kombiniert, der im intergenischen Bereich zwischen *mvdD* und *mvdE* band mit einem Amplicon von 2 kb (Abb. 23, Nr. 6b). Die PCR Produkte waren für beide Primerpaare spezifisch. Die PCRs mussten nicht mit veränderten Annelingtemperaturen wiederholt werden und es waren alle *P. agardhii* und *P. rubescens* Isolate positiv. Nur bei *P. pseudagardhii* und den Gattungen *Geitlerinema* und *Oscillatoria* wurde kein Microviridin Gencluster nachgewiesen. Insgesamt waren 122 von 142 Isolaten positiv.

3.1.7 Planktocylin Gencluster (*pag*)

Es wurden zwei Primerpaare für das Screening verwendet. Das erste Primerpaar amplifizierte *pagA*, einer N-terminale Protease mit einem Amplicon von 489 bp (Abb. 23, Nr. 7a) und der zweite Primer amplifizierte *pagG*, eine C-terminalen Protease (500 bp, Abb. 23, Nr. 7b). Die Banden der PCRs für den Nachweis des Planktocylin Genclusters waren sehr stark und spezifisch. Es konnte erneut für alle 122 *P. agardhii* und *P. rubescens* Isolate der Planktocytingencluster nachgewiesen werden.

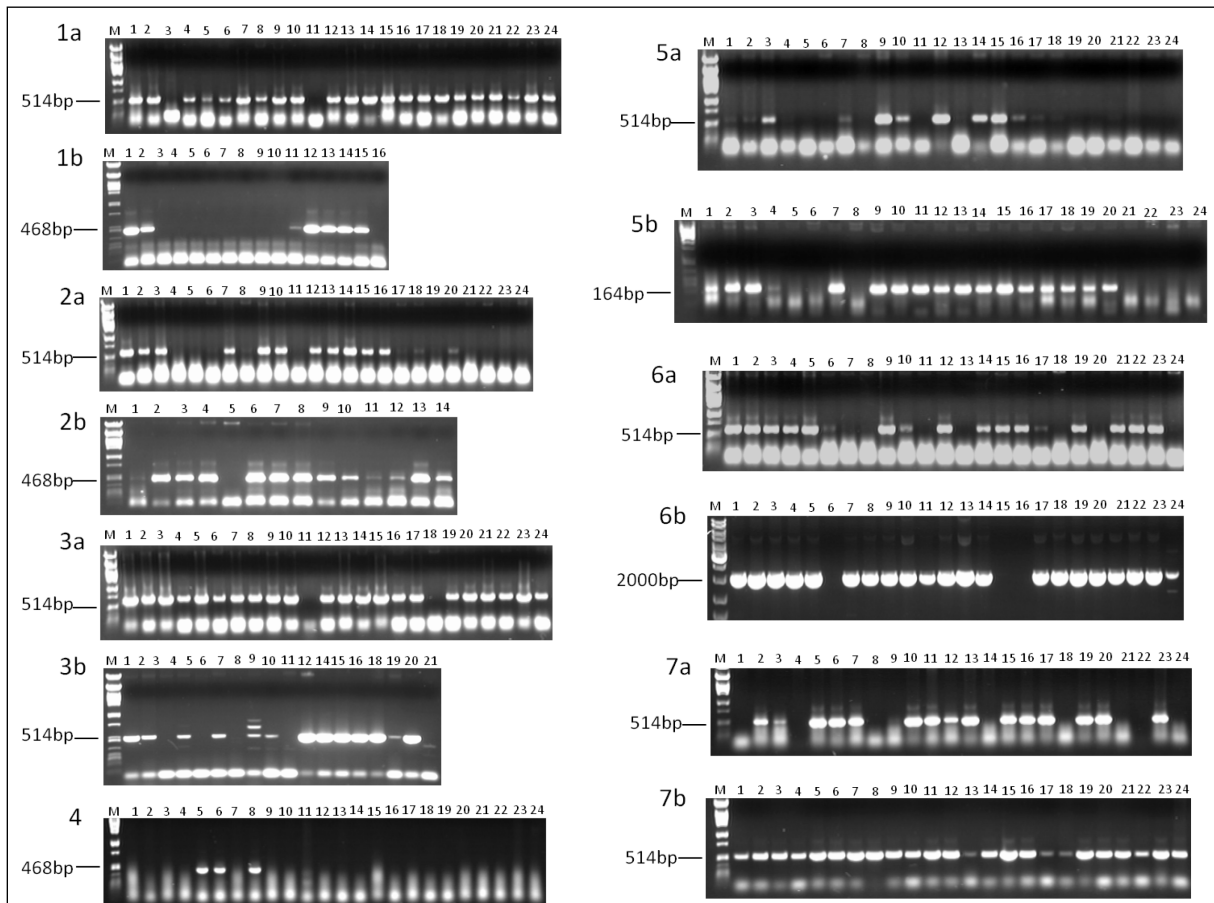


Abb. 23 Gelbilder zur Präsenz oder Absenz der PCR Produkte der untersuchten Peptidgencluster. 1a+b Aeruginosin, 2a+b Anabaenopeptin, 3a+b Cyanopeptolin, 4 Microginin, 5a+b Microcystin, 6a+b Microviridin und 7a+b Planktocylin. Marker λ /PstI, außer bei Bild 6a GeneRuler DNA Ladder Mix; bei Gelbild 5b 2% iges Gel, sonst alle 0,8% ig

Tab. 8 Auflistung der Peptidgencluster Verteilung. schwarze Felder: Gencluster vorhanden, graue Felder: Genreste vorhanden, weiße Felder: Gencluster nicht vorhanden; V.linie von *P. agardhii* und *P. rubescens* nach Christiansen et al (2008). ^a *mcy* inaktiv, ^b Gattung *Oscillatoria*, ^c *Geitlerinema*, ^d *P. pseudagardhii*

Isolat	V.linie	<i>acr</i>	<i>apn</i>	<i>oci</i>	<i>mcy</i>	<i>mic</i>	<i>mvd</i>	<i>pag</i>
31/1	1							
32	1							
39	1							
41	1							
63	1							
66	1							
79	1							
250	1							
251	1							
252	1							
253	1							
254	1							
255	1							
256	1							
257	1							
259	1							
274	1							
281	1							
299	1							
307	1							
320	1							
354	1							
394	1							
554	1							
759	1							
760	1							
781	1							
782	1							
787	1							
788	1							
790	1							
828	1							
829	1							
836	1							
976	1							
2A	1							
1459/15	1							
CYA126/8	1							
PCC7805	1							
PCC7811	1							
SAG5.81	1							
SAG6.89	1							
277	1A							
364	1A							
365	1A							
371	1A							
372	1A							
384	1A							
390	1A							
396	1A							
553	1A							
557	1A							
3	2							
40 ^a	2							

Isolat	V.linie	<i>acr</i>	<i>apn</i>	<i>oci</i>	<i>mcy</i>	<i>mic</i>	<i>mvd</i>	<i>pag</i>
64	2							
80	2							
97	2							
108	2							
110 ^a	2							
111	2							
139 ^a	2							
145 ^a	2							
161 ^a	2							
166 ^a	2							
169 ^a	2							
170 ^a	2							
178 ^a	2							
260	2							
403 ^a	2							
405 ^a	2							
406 ^a	2							
549 ^a	2							
550 ^a	2							
551 ^a	2							
761	2							
762	2							
775	2							
776	2							
777	2							
778	2							
779	2							
804	2							
805	2							
806	2							
807	2							
808	2							
814	2							
815	2							
816	2							
830	2							
838	2							
839	2							
840	2							
21-	2							
496/1 ^a	2							
91/1 ^a	2							
A7	2							
1459/11A	2							
1459/14	2							
1459/16	2							
1459/17	2							
1459/21	2							
1459/30	2							
1459/31	2							
1460/5	2							
PCC7821	2							
757	2A							
758	2A							

Isolat	V.linie	<i>acr</i>	<i>apn</i>	<i>oci</i>	<i>mcy</i>	<i>mic</i>	<i>mvd</i>	<i>pag</i>
763	2A							
764	2A							
765	2A							
766	2A							
769	2A							
770	2A							
771	2A							
772	2A							
865	2A							
873	2A							
1459/36 ^a	2A							
704 ^d	3							
707 ^d	3							
708 ^d	3							
710 ^d	3							
711 ^d	3							
712 ^d	3							
713 ^d	3							
PCC9214 ^d	3							
67 ^a	4							
82	4							
83/2	4							
916 ^c	-							
934 ^c	-							
977 ^c	-							
978 ^c	-							
979 ^c	-							
980 ^d	-							
981 ^c	-							
982 ^c	-							
Furnas 2 ^c	-							
Daniel 1 ^c	-							
PCC6506 ^b	-							
697 ^b	-							

Wie aus der Tab. 8 ersichtlich, war der Gencluster für die Cyanopeptolinsynthetase mit 126 Isolaten am häufigsten vertreten. Erstaunlich dabei ist, dass der *oci* Gencluster als einziger auch bei Isolaten aus der Gattung *P. pseudagardhii* und *Geitlerinema* gefunden wurde (Abb. 24). Innerhalb der Gattungen *P. agardhii* und *P. rubescens* waren die Aeruginosinsynthetase sowie der Microviridin und Planktocyclus Gencluster mit 122 positiven Stämmen am zweithäufigsten vertreten. Mit etwas Abstand folgte der Anabaenopeptinsynthetase Gencluster mit nur 107 positiven Isolaten. Der Microcystinsynthetase Gencluster wurde bei nur 76 Stämmen nachgewiesen. Am seltensten, mit nur 11 positiven Isolaten, war der Microginingencluster vertreten.

Ein Spezialfall war der Stamm PCC7821 aus dem Lake Gjersjoen (Norwegen), der als einziger alle sieben Peptid Gencluster aufwies.

Bis auf den Cyanopeptolinsynthetase Gencluster konnte kein weiterer Peptidgencluster bei den Gattungen *Oscillatoria*, *Geitlerinema* und *P. pseudagardhii* nachgewiesen werden.

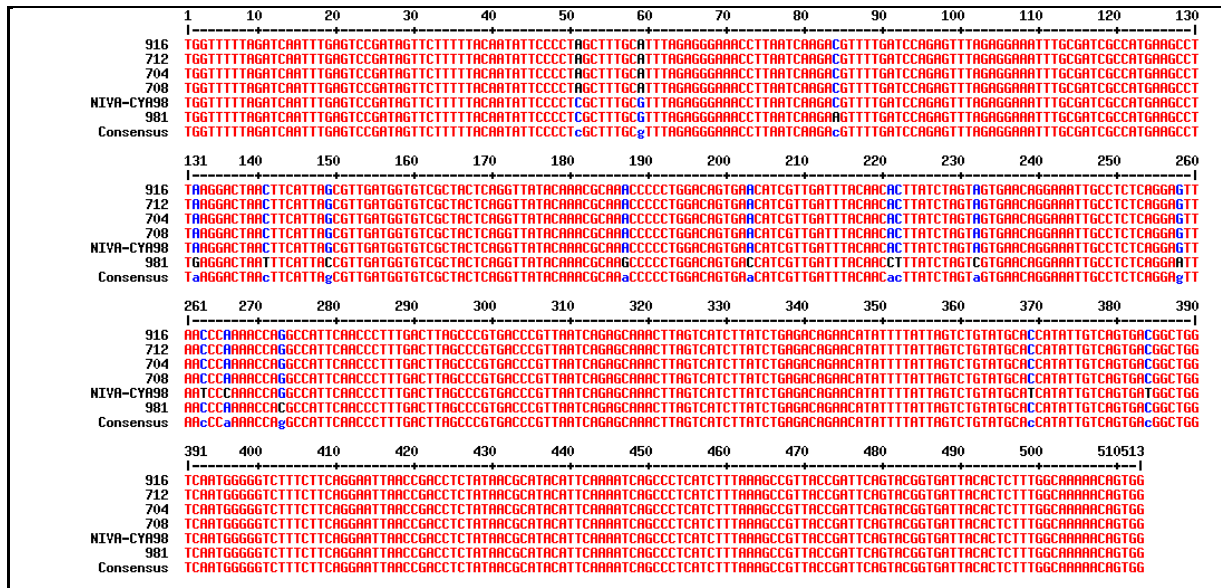


Abb. 24 *ociB* (Ahp) Sequenzalignment

Dieses Alignment der Isolate aus der Gattung *P. pseudogardhii* (704, 708 und 712) und *Geitlerinema* (916 und 981) zeigte den konservierten Abschnitt der Adenylierungsdomäne für die Aktivierung der AS 3-amino-6-hydroxy-2-piperidone (Ahp). Im Vergleich wurde der Stamm *P. rubescens* NIVA-CYA 98 (NCBI AM990463) im Alignment dargestellt, um sicher zu gehen, dass das PCR Produkt spezifisch war.

3.2 Verlust von NRPS

3.2.1 Microcystin

Der Gencluster für das Toxin Microcystin war im Vergleich zu den *aer*, *oci*, *mvd* und *pag* Genclustern wesentlich weniger häufig vertreten. Der Grund hierfür ist vermutlich der Verlust des gesamten *mcy* Gencluster, bis auf kurze Reste des *mcyT* Gens. Dies wurde bereits für einzelne Isolate bestätigt (Christiansen et al 2008). Es wurden alle nicht-toxischen Isolate, die den *mcy* Gencluster also verloren haben nach *mcyT* Resten abgesucht. Bei allen nicht-toxischen Isolaten konnte ein *mcyT* Rest gefunden werden und zusätzlich konnte der gleiche *mcyT* Rest auch in Isolaten der Art *P. pseudogardhii* nachgewiesen werden (Abb. 25).

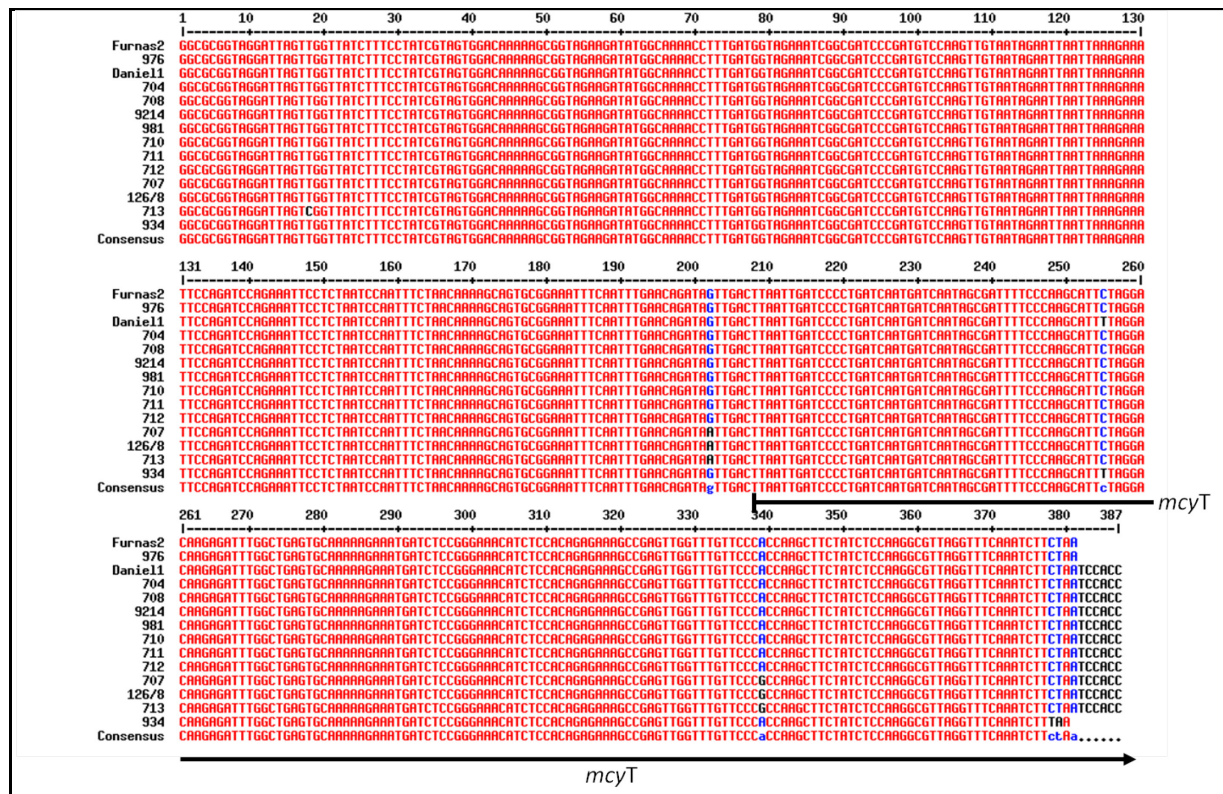


Abb. 25 Sequenzalignment der 5' flankierenden Region von *mcYT* und *mcYT* Rest

Dieser *mcYT* Rest war auch über unterschiedliche Gattungen hinweg konserviert. Zum Vergleich wurde auch der Stamm *P. agardhii* NIVA-CYA 126/8 im Alignment dargestellt, um sicher zu gehen, dass das PCR Produkt spezifisch war. Bei den Isolaten Furnas 2, Daniel 1, 981 und 934 handelte es sich um die Gattung *Geitlerinema*. Zu *P. pseudagardhii* gehörte die Isolate PCC9214, 704, 707, 708, 710, 711, 712 und 713.

Generell wurden als inaktive Microcystingenotypen solche Stämme bezeichnet bei denen zwar der gesamte Gencluster vorhanden war, trotzdem aber kein Microcystin produziert wurde. Ein Beispiel für inaktive *mcY* Stämme waren die Isolate aus dem Moore Lake (Kananda), bei denen der Gencluster schrittweise durch PCR der einzelnen Genregionen auf mögliche Mutationen (Insertion oder Deletion) abgetastet wurde. Jeder dieser screening Primer überprüfte einen ca. 3.5 kb großen Abschnitt von *mcY*. Folgende Isolate wurden untersucht: 403, 405, 406, 549, 550, 551 und 496/1. Es wurde exemplarisch dazu ein Gelbild hinzugefügt.

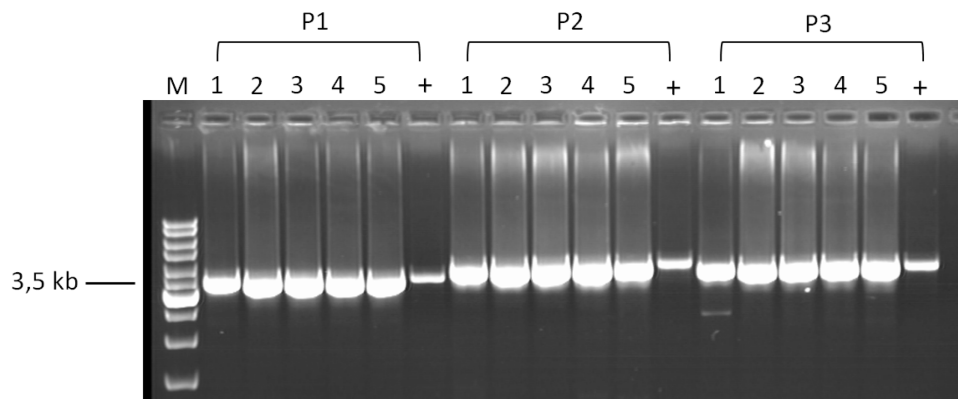


Abb. 26 Amplifikation der einzelnen aneinandergrenzenden Genregionen des kompletten Microcystingencluster (55 kb). Bahn 1: 403, 2: 405, 3: 406, 4: 496/1, 5: 549, + 126/8; P1 Primer Fmcy1, P2 Primer Fmcy2, P3 Primer Fmcy3; Marker GeneRuler DNA Ladder Mix

Die positiv Kontrolle war der Stamm *P. agardhii* NIVA-CYA 126/8 und wurde zum Größenvergleich eingesetzt. Es wurden bei allen Isolaten keine größeren Insertionen und Deletionen gefunden. Einzelne Punktmutationen konnte man bei einer Amplikongröße von ca. 3.5kb natürlich nicht erkennen. Alle Stämme hatten bei allen 16 Primern gleich große PCR Produkte wie bei der jeweiligen positiv Kontrolle.

3.2.2 Anabaenopeptin

Der Anabaenopeptin Gencluster war nicht so häufig von Verlust Ereignissen betroffen wie der Microcystingencluster, jedoch gab es 15 Isolate bei denen die anfängliche PCR mit den TE und NMT Primern kein Ergebnis brachte (Tab. 8). Es wurde jedoch bei all diesen Stämmen durch die Überbrückungs PCR der benachbarte Microviridingencluster nachgewiesen. Der verwendete Primer für diese Clusterbrücken PCR wurde in *apnE* gelegt, somit musste ein Teil von diesem Gen vorhanden sein. Dieser Genrest diente als Startpunkt des Genome Walking, wofür exemplarisch zwei Stämme ausgesucht wurden. Die Intention für das Genome Walking war es herauszufinden, warum große Teile des Anabaenopeptin Genclusters nicht mehr vorhanden waren.

3.2.3 Cyanopeptolin

Für Cyanopeptolin gab es nur ein *Planktothrix* Isolat bei dem die normalen screening Primer nicht funktioniert haben (Tab. 8). Es handelte sich um den Stamm 758 aus dem Lake Hormajärvi (Finnland). Bei allen restlichen Isolaten konnte der Cyanopeptolingencluster nachgewiesen werden. Bei dem Isolat 758 wurden nur Reste der beiden Gene *ociD* (5' Ende) und *ociC* (3' Ende) gefunden (Abb. 27). Hierfür wurde versucht den gesamten Cyanopeptolingencluster mit 17 Primern im Abstand von ca. 2 kb nachzuweisen. Nachdem keine PCR Produkte erhalten wurden, dürften die restlichen Gene dazwischen verloren gegangen sein. Um herauszufinden wie die Gene verloren gingen, wurde dieser Stamm 758 ebenfalls für das Genome Walking ausgesucht. Es konnten leider beim Genome Walking keine spezifischen Sequenzen generiert werden. Der Grund war unbekannt.

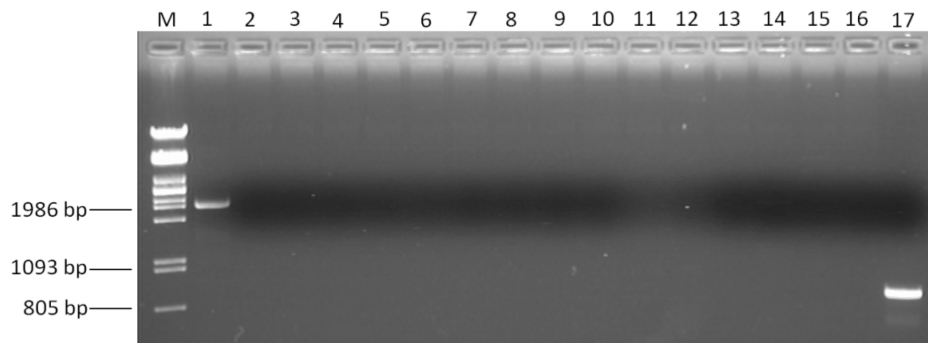


Abb. 27 Versuch der Amplifikation der einzelnen Genregionen des Cyanopeptolingenclusters für den Stamm 758. Bande 1 ist 2kb, Bande 17 ist 900bp groß; Marker λ /PstI

3.3 Suche nach Genresten in NRPS mittels der Genome Walking Methode

Für die Anwendung der Genome Walking Methode wären 16 Isolate in Frage gekommen, die Teile ihres *apn* oder *oci* Genclusters verloren hatten. Der *apn* Gencluster war davon 15 mal und der *oci* Gencluster einmal betroffen (Tab. 8). Für *apn* wurden jedoch nur zwei Isolate 257 (Albufera Lagune, ES) und 976 (Tucson, US) ausgesucht, um jeweils einen Vertreter pro Kontinent zu haben. Bei *oci* handelte es sich um den Stamm 758 (Lake Hormajärvi, FI).

3.3.1 Anabaenopeptin

Alle 15 Isolate, die den *apn* Gencluster verloren hatten gehörten zu der Verwandtschaftslinie 1 und waren nicht toxisch. Diese nicht toxischen Isolate wiesen nur noch Reste des *mcy* Genclusters auf wie *mcyT* oder *mcyJ* (Christiansen et al 2008). Dies könnte in ähnlicher Form auch bei dem *apn* Gencluster aufgetreten sein. Diese Vermutung konnte durch die Ergebnisse des Genome Walking bestätigt werden (Abb. 28).

Als Startpunkte für das Genome Walking wurden zwei Sequenzabschnitte gewählt, die schon durch die Clusterbrücken PCR's nachgewiesen wurden. Dies war am 5'Ende in *apnE* und am 3'Ende in der IGS Region von *apnA/ociD*.

Durch die ungleich großen Genreste von *apnE* und das unterschiedliche Insert konnte man zwei Typen definieren. Bei einem vollständigen *apn* Gencluster hatte das *apnE* Gen eine Größe von 2 kb. Bei Isolat 257 waren nur noch 662 bp von *apnE* vorhanden. Direkt angrenzend am Abbruch des *apnE* Gens wurde eine 1046 bp lange nicht spezifischen Sequenz entdeckt. Mit Hilfe eines nBlast wurde eine Übereinstimmung mit einem Protein DUF433 unbekannter Funktion von *Oscillatoria nigroviridis* PCC 7112 gefunden. Mit blastx wurde in der Protein Datenbank eine Ähnlichkeit mit einer IS1414 (MULE Transposase Domäne) und Tc5 (HTH_Tnp_Tc5) Transposase gefunden.

Bei dem Isolat 976 war das Restfragment von *apnE* mit nur 307 bp wesentlich kleiner als beim Isolat 257. Die Insertionssequenz mit 901 bp konnte durch einen nBLAST eindeutig der bekannten Transposase ISPlag1 (Christiansen et al 2008) zugewiesen werden.

Die Sequenzierung der IGS Region zwischen dem *apn* und *oci* Gencluster brachte bei beiden Isolaten (257, 976) keine Überraschungen. Der IGS Bereich mit 2881 bp (257) bzw. 3222 bp (967) ab dem Gen *ociD* in Richtung *apnA* war bis auf einige Punktmutationen identisch mit jenen Isolaten, die keine Deletion des *apn* Gencluster aufwiesen.

Durch die Annahme, dass ein Großteil des *apn* Genclusters verloren ging, wurde auch versucht den *apn* Gencluster zu überbrücken. Hierfür wurden die forward Primer (gw257apnEBr, gw976apnEBr) in die neuentdeckte Sequenz gelegt und mit dem reverse Primer (gwCptIGi) in der IGS Region kombiniert. Auch durch die Anwendung verschiedener PCR Protokolle konnte keine erfolgreiche Überbrückung des *apn* Genclusters erreicht werden. Daher wurden auch in der Abbildung die einzelnen *apn* Gene gepunktet dargestellt, da keine Aussage über deren Verlust gemacht werden konnte.

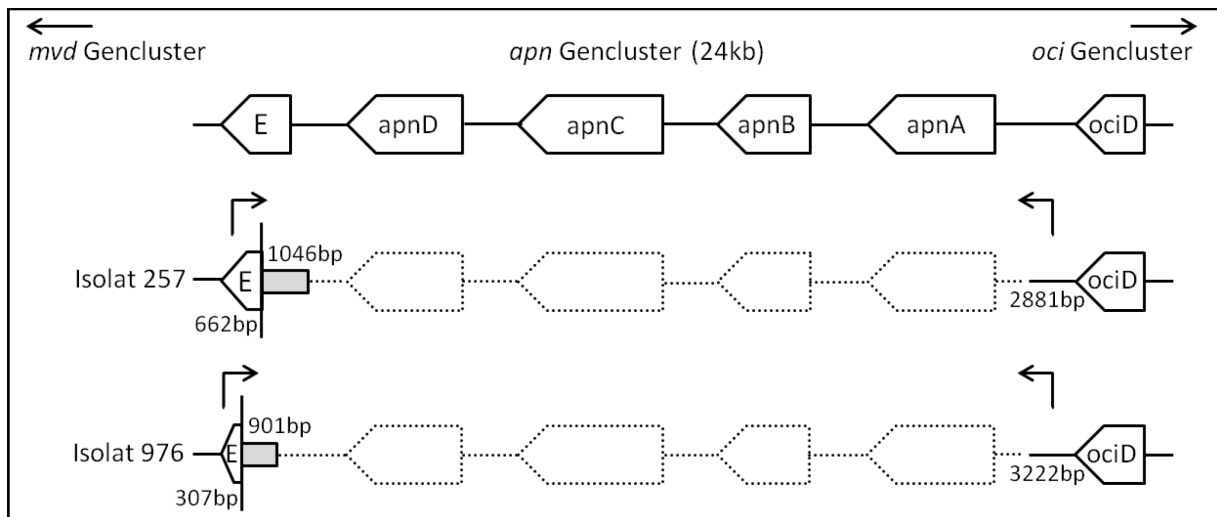


Abb. 28 Überblick der gefundenen *apn* Gencluster Reste bei Isolaten, die den Gencluster verloren hatten. Die eckigen Pfeile am 5' und 3' Ende des *apn* Genclusters markierten die jeweiligen Startpunkte des Genome Walking. Der Genabbruch bei *apnE* wurde durch die vertikale Linie dargestellt. Die grauen Fragmente mit 1046 bp und 901 bp waren Sequenzen von IS Elementen oder von hypothetischen Proteinen unbekannter Funktion. Die gepunkteten Bereiche stellten die vermuteten Deletionen des *apn* Genclusters dar.

3.3.2 Cyanopeptolin

Bei den PCR's zur Überprüfung der Präsenz oder Absenz der Peptid Gencluster, war einzig der Stamm 758 (Lake Hormajärvi, FI) für den *oci* Gencluster negativ. Ein screening des gesamten Genclusters von Isolat 758 mit 17 Primern zeigte, dass zumindest Reste von *ociD* (ca. 2 kb) und *ociC* (ca. 900 bp) vorhanden waren (Abb. 27). Diese zwei Sequenzbereiche am 5' und 3' Ende des Genclusters waren die Startpunkte für das Genome Walking (verwendete Primer siehe Tab. 1). Aus nicht bekannten Gründen ergab das Genome Walking keine spezifischen Resultate, da zumindest jeweils ein Teil von *ociD* und *ociC* bei den erhaltenen Sequenzen dabei sein sollte. Dies war aber nicht der Fall. Eine Überbrückung des *oci* Gencluster wurde ebenfalls versucht und war ebenfalls nicht erfolgreich. Somit konnte das Genome Walking bei dem Isolat 758 keine Erklärung liefern, warum der

Sequenzbereich zwischen *ociD* und *ociC* beim Screening des *oci* Genclusters keine positiven PCR Ergebnisse lieferte.

3.4 Anordnung dreier Peptid(synthetase)gencluster im Genom (Multipeptidgencluster)

Das geblockte Vorkommen von *mvd*, *apn* und *oci* bezeichnete man als Multipeptidgencluster. Diese direkt benachbarte Anordnung von Peptidclustern im Genom ist bemerkenswert. Nachdem diese drei einzelnen Gencluster nur wenige kb voneinander entfernt waren (Abb. 29), kann eine zufällige Aneinanderreihung ausgeschlossen werden. Diese Anordnung setzte sich aus den Genclustern für das ribosomale Microviridin und den nicht-ribosomalen Peptiden Anabaenopeptin und Cyanopeptolin zusammen. Insgesamt umfasste dieser Multipeptidgencluster ca. 60 kb.

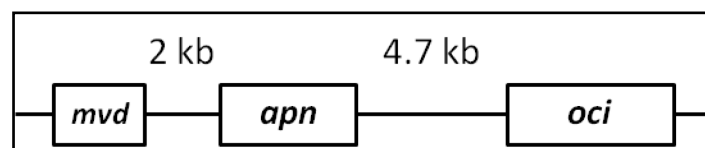


Abb. 29 Multipeptidgencluster Überblick

Für diese PCRs wurden die 122 positiven *mvd* Isolate herangezogen (Tab. 8). Zum Nachweis der Nachbarschaft von *mvd* zu *apn* wurde der forward Primer in *mvdA* und der reverse Primer in *apnE* gelegt. Für die PCR wurde die Phusion DNA Polymerase verwendet und zur Überprüfung wurden die Produkte auf ein 0.8% iges Agarosegel aufgetragen. Es wurde wieder exemplarisch pro IGS Region nur ein Gelbild gezeigt. Die PCR Produkte zeigten sehr deutliche Banden und es konnte kein Größenpolymorphismus gefunden werden.

Das Ergebnis dieser PCR zeigte, dass bei allen 122 getesteten Isolaten der *mvd* Gencluster direkt benachbart zu dem *apn* Gencluster war (Abb. 30).

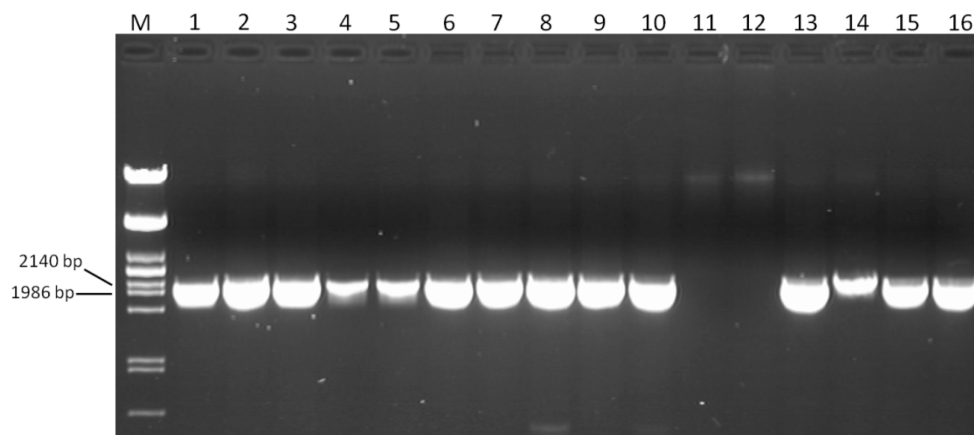


Abb. 30 Überbrückungs PCR Ergebnisse zur Überprüfung der benachbarten Anordnung des *mvd* und *apn* Genclusters im Genom; Marker λ /PstI

Zur Überbrückung der zweiten IGS Region von *apn* zu *oci* Gencluster wurde der forward Primer in *apnA* mit dem reverse Primer in *ociD* kombiniert. Diese IGS Region war mehr als doppelt so groß (). Die PCR Ergebnisse waren sehr spezifisch und es konnte die Nachbarschaft für beinahe alle Isolate bestätigt werden. Jene 15 Isolate, die vermutlich den Anabaenopeptingencluster verloren haben, ergab nur der Stamm 828 aus dem Lake Nero (Russland) ein positives PCR Produkt (Abb. 31).

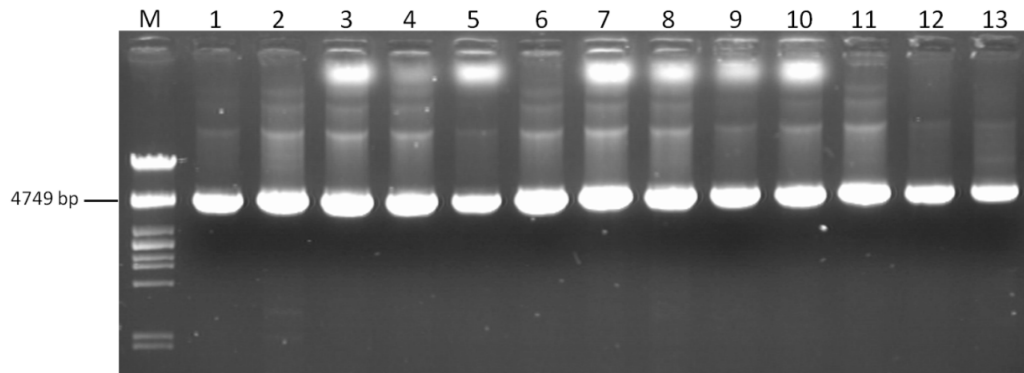


Abb. 31 Überbrückungs PCR Ergebnisse zur Überprüfung der benachbarten Anordnung des *apn* und *oci* Genclusters im Genom; Marker λ /PstI

Bei diesen Clusterbrücken PCRs von *apn* zu *oci* Gencluster wurde bei vier Isolaten ein Polymorphismus (IS Element) von zwei kb entdeckt (Abb. 32).

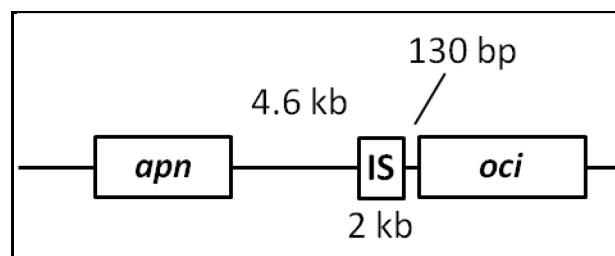


Abb. 32 Multipeptidgencluster mit mobilen Element (IS) in der IGS Region

Um nicht die ganze IGS Region von 4.7 kb sequenzieren zu müssen, wurde dieser mit einem sich überlappendem Intermed Primer in einen 2.3 kb und einen 2.6 kb großen Bereich geteilt. Weiters wurden auch einige andere Isolate mit den Intermed Primern amplifiziert, die zuvor noch kein PCR Produkt ergaben. Dabei wurde der forward Primer in *apnA* mit dem Intermed reverse Primer und der Intermed forward Primer mit dem reverse Primer in *ociD* kombiniert. Durch diese PCR konnte gezeigt werden, dass sich das IS Element im 2. Teil (2.6 kb) der IGS Region befindet (Abb. 33).

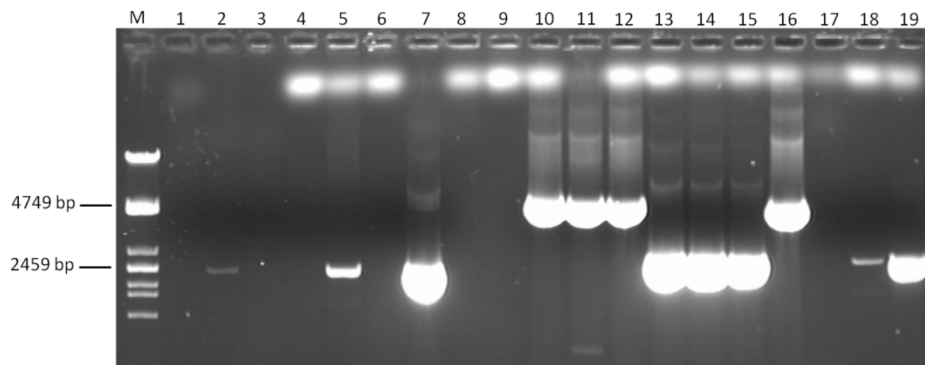


Abb. 33 Größen Polymorphismus zwischen *apn* und *oci* Gencluster. Bahn 10-12 zeigten die Isolate 41, 63 und 66 (Jägerteich, AT), Bahn 16: Isolat 253 (Albufera Lagune, ES); Marker λ /PstI

Bei den Isolaten aus dem Jägerteich und der Albufera Lagune handelte es sich um die Stämme mit dem IS Element. Die anderen Bahnen im Vergleich zeigten Isolate ohne IS Element in der IGS Region. Durch die Sequenzierung des IS Element konnte gezeigt werden, dass es sich bei allen vier Isolaten um das gleiche mobile Element handelte. Wobei bei den drei Isolaten aus dem Jägerteich nur der Stamm 66 stellvertretend sequenziert wurde, da eine Restriktionsverdau-Analyse das gleiche Schnittmuster aufwies.

Ein Alignment der Sequenzen von Stamm 66 und 253 zeigte, dass es sich um das gleiche IS Element handelte (Abb. 34). Bei Stamm 253 war es reverse komplementär inseriert.

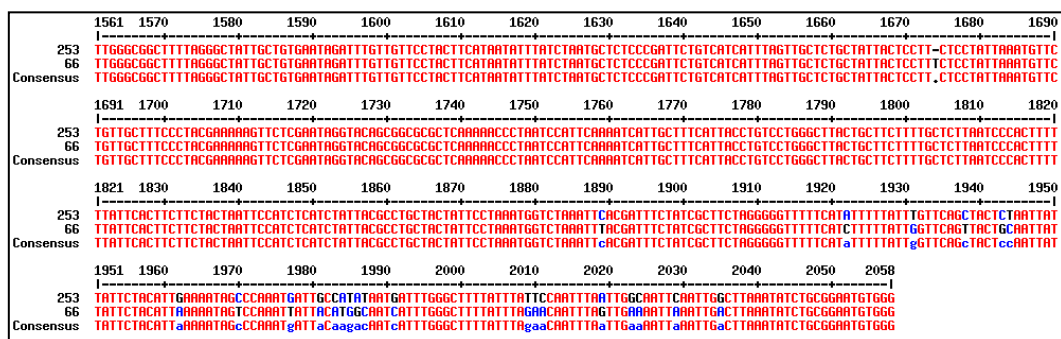


Abb. 34 IS-Element Sequenzvergleich

In Abb. 34 wurde nur der Teil mit Punktmutationen gezeigt, da der Rest des IS-Elements komplett ident ist. Mit Hilfe des IS Finders und NCBI BLAST konnte dieses mobile Element der IS Familie IS4 oder IS1634 zugeordnet werden.

Für einen Gesamtüberblick der Ergebnisse der Multiplexidengencluster PCRs wurde die folgende Abb. 35 erstellt.

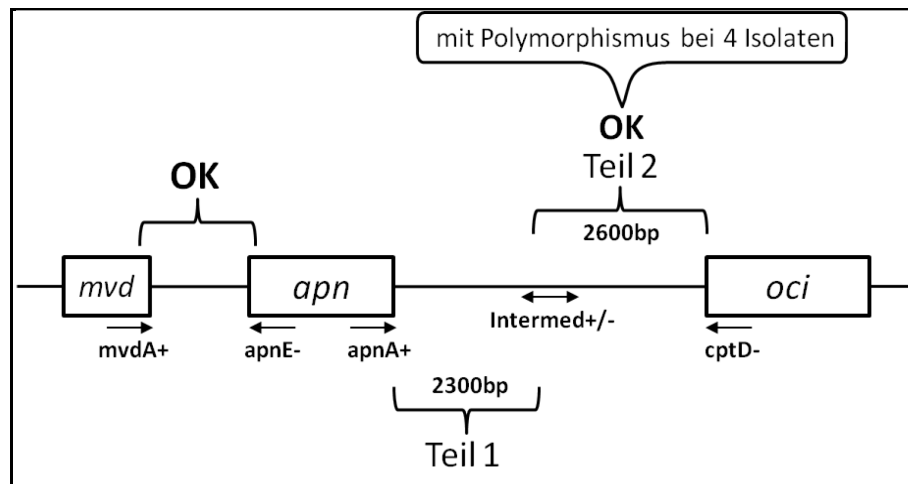


Abb. 35 Gesamtüberblick der Überbrückungs PCR Ergebnisse

Die mit OK bezeichneten Bereiche waren für alle 122 getesteten Isolate positiv. Nur für die 15 *apn* negativen Isolate, mit Ausnahme des Stammes 828 (Lake Nero, Russland) konnte keine direkte Nachbarschaft zu dem *oci* Gencluster festgestellt werden (Tab. 9).

Tab. 9 Auflistung der Isolate, für die keine direkte Nachbarschaft zum *oci* Gencluster gefunden wurde

Isolat	Spezies	Herkunft	Verwandtschaftslinie
250-257	<i>P. agardhii</i>	Albufera Lagune, ES	1
274	<i>P. agardhii</i>	Wannsee, DE	1
299	<i>P. agardhii</i>	Klinkenbergerplas, NL	1
760	<i>P. agardhii</i>	St. Domingos, PT	1
782	<i>P. agardhii</i>	St. Domingos, PT	1
790	<i>P. agardhii</i>	St. Domingos, PT	1
976	<i>P. agardhii</i>	Tucson, US	1

Es wurden die Isolate 257 und 976 für das Genome Walking ausgewählt.

3.5 Funktionelle Rekombinationen des ribosomalen Peptids Microviridin

3.5.1 Vorhandensein oder Fehlen der Acetyltransferase

Abgesehen von den unterschiedlichen Precursorvarianten war der einzige größere Polymorphismus im *mvd* Gencluster, das Vorhandensein oder Fehlen des *mvdB* Gens, das für die Acetyltransferase (Act) codiert. Das Act Gen war 600 bp groß.

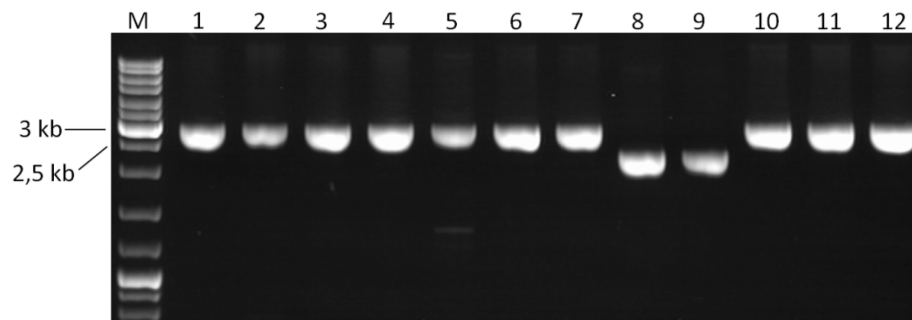


Abb. 36 Überprüfung des *mvd* Genclusters auf Größenpolymorphismen. Forward Primer: *mvdexE+*, reverse Primer: *mvdIntmed-*; Marker GeneRuler DNA Ladder Mix

Auf der Abb. 36 waren auf den Bahnen 8 und 9 zwei Isolate zu sehen, die das *mvdB* Gen nicht aufwiesen. Die Differenz im PCR Produkt entspricht der erwarteten Größe des *mvdB* Gens. Die komplette Auflistung der 122 positiven *mvd* Stämme bezüglich des Vorhandenseins bzw. Fehlens des Act Gens ist in der folgenden Tab. 10 ersichtlich. Der Stamm NIES204 wurde für diese PCR mitgetestet.

Tab. 10 Präsenz und Absenz des *mvdB* (Act) Gens. schwarz: *mvdB*+, weiß: *mvdB*-

Isolat	V. Linie	<i>mvdB</i>	Isolat	V. Linie	<i>mvdB</i>	Isolat	V. Linie	<i>mvdB</i>	Isolat	V. Linie	<i>mvdB</i>
31/1	1		SAG5.81	1		779	2		82	4	
32	1		SAG6.89	1		804	2		83/2	4	
39	1		277	1A		805	2		NIES204		
41	1		364	1A		806	2				
63	1		365	1A		807	2				
66	1		371	1A		808	2				
79	1		372	1A		814	2				
250	1		384	1A		815	2				
251	1		390	1A		816	2				
252	1		396	1A		830	2				
253	1		553	1A		838	2				
254	1		557	1A		839	2				
255	1		3	2		840	2				
256	1		40	2		21-	2				
257	1		64	2		496/1	2				
259	1		80	2		91/1	2				
274	1		97	2		A7	2				
281	1		108	2		1459/11A	2				
299	1		110	2		1459/14	2				
307	1		111	2		1459/16	2				
320	1		139	2		1459/17	2				
354	1		145	2		1459/21	2				
394	1		161	2		1459/30	2				
554	1		166	2		1459/31	2				
759	1		169	2		1460/5	2				
760	1		170	2		PCC7821	2				
781	1		178	2		757	2A				
782	1		260	2		758	2A				
787	1		403	2		763	2A				
788	1		405	2		764	2A				
790	1		406	2		765	2A				
828	1		549	2		766	2A				
829	1		550	2		769	2A				
836	1		551	2		770	2A				
976	1		761	2		771	2A				
2A	1		762	2		772	2A				
1459/15	1		775	2		865	2A				
CYA126/8	1		776	2		873	2A				
PCC7805	1		777	2		1459/36	2A				
PCC7811	1		778	2		67	4				

Bis auf den Stamm 277 aus dem Wannsee (Deutschland), der den nicht-toxischen Isolat (Verwandtschaftslinie 1A) zugeordnet war, waren alle Stämme ohne *mvdB* Gen aus der Verwandtschaftslinie 2 bzw. 2A (toxische Isolate).

Insgesamt wiesen 29 von 123 Stämmen kein *mvdB* Gen auf, das entsprach aufgerundet nur 24%.

Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, ob es sich bei dem *mvdB* Gen um einen Verlust oder Gewinn in *mvd* handelte, wurde die IGS Region zwischen *mvdA* und *mvdC* von sechs Isolat, die kein *mvdB* Gen aufwiesen exemplarisch sequenziert (Tab. 11). Weiters wurde noch der Stamm NIVA-CYA34 aus der NCBI Datenbank für das Alignment hinzugenommen, der ebenfalls kein *mvdB* Gen aufwies.

Tab. 11 Isolate für die *mvdB* Sequenzierung

Isolat	Spezies	Herkunft	Verwandtschaftslinie
277	<i>P. agardhii</i>	Wannsee, DE	1A
779	<i>P. rubescens</i>	Reservoir Nicollelli, IT	2
804	<i>P. agardhii</i>	Winnecook Lake, US	2
840	<i>P. rubescens</i>	Reservoir Garcia, IT	2
757	<i>P. agardhii</i>	Lake Hormajärvi, FI	2A
CCAP1459/36	<i>P. agardhii</i>	Lake Gjersjoen, NO	2A

Es wurden Stämme ausgesucht, die aus verschiedenen Seen isoliert und teilweise in unterschiedliche Verwandtschaftslinien eingeordnet wurden.

Zum Vergleich der IGS Region wurde ein Alignment gemacht (Abb. 37), wobei der kurze Sequenzabschnitt von *mvdA* und *mvdC* für die Primerbindestellen nicht berücksichtigt wurde.

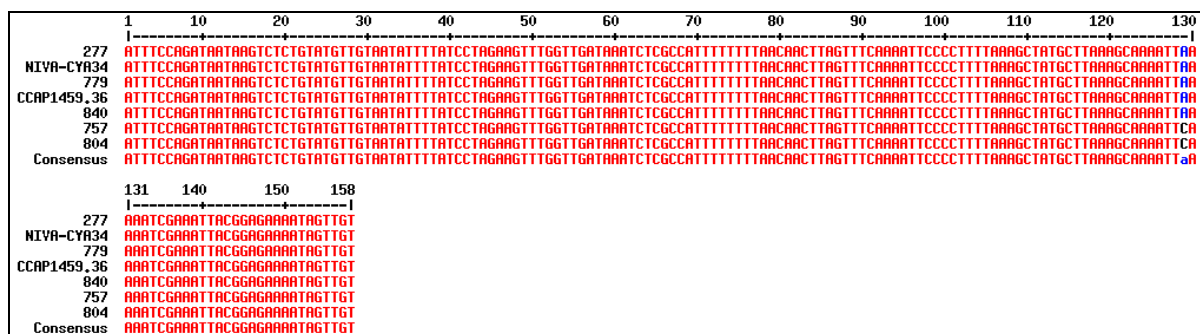


Abb. 37 Alignment der IGS Region von *mvdA/C*

Die Sequenzen zwischen *mvdA* und *mvdC* waren praktisch ident. Lediglich die Isolate 757 und 804 zeigten eine Punktmutation.

3.5.2 Precursorpeptidgene

Bei der Sequenzierung der 122 positiven *mvd* Isolate wurden 19 verschiedene Precursor (Corepeptide) Varianten gefunden. Für diese PCRs wurde auch noch später der Stamm NIES204 hinzugenommen., wodurch es insgesamt 123 Isolate gab. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Diplomarbeit war der Stamm NIES204 in keine Verwandtschaftslinie eingeteilt worden, wodurch es auch nicht bei den folgenden Diagrammen mit Bezug auf die Verwandtschaftslinien berücksichtigt wurde.

Für die Amplifizierung der Precursorgene wurde der forward Primer in *mvdD* und der reverse Primer in *adpF* gelegt. Aufgrund der Größe der PCR Produkte konnte man die Isolate nach der Anzahl der vorhandenen Precursor in drei unterschiedliche *mvd* Typen einteilen. Der *mvd* Typ 1 hatte nur einen Precursor, der Typ 2 zwei und der Typ 3 hatte drei Precursorgene vorzuweisen. Diese Typen konnte man am Agarosegel sehr gut unterscheiden (Abb. 38). Es wurde exemplarisch wieder nur ein Gelbild hinzugefügt.

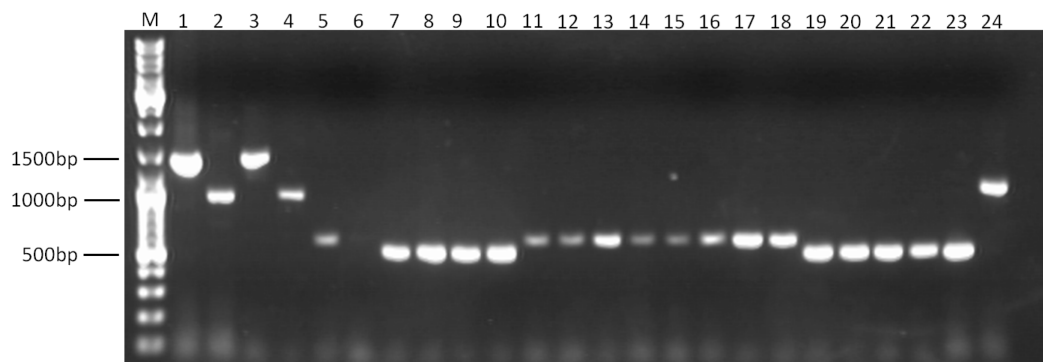


Abb. 38 Größenpolymorphismen bei der Amplifikation der Precursorgene; Marker GeneRuler DNA Ladder Mix

Auf diesem Gelbild waren auf den Bahnen 1 und 3 mit ca. 1500 bp der *mvd* Typ 3 zu sehen. Auf den Bahnen 2, 4 und 24 mit 1000 bp war der Typ 2 zu finden. Die restlichen Banden waren alle Typ 1 mit 500 bp, wobei hier bei einigen Isolaten (Bahn 5 und 11-18) ein kleiner Größenpolymorphismus zu sehen war, der im Kapitel 3.5.5 besprochen wird.

Insgesamt dominierte der *mvd* Typ 1 mit 83 von 123 Isolaten, gefolgt vom Typ 2 mit 26 Isolaten und am wenigsten Vertreter hatte der Typ 3 mit 14 Isolaten. Bei den Typ 1 Isolaten gab es trotz hoher Abundanz mit nur zwei Precursor Varianten (Corepeptid N und R) die geringste Variation (siehe Kapitel 3.5.3). Der Precursor R war nur in den Typ 1, der Precursor N hingegen auch in Typ 3 Isolaten vertreten. Die restlichen 17 Precursor Varianten verteilten sich auf Typ 2 und Typ 3 Isolate, wobei es nur in Typ 2 einzigartige Precursor Kombinationen gab. Die Isolate der Verwandtschaftslinie 1 und 1A (nicht-toxisch) zeigten die größte Variation mit den meisten *mvd* Typ 2 + 3.

Die folgende Abb. 39 zeigte die Verteilung der *mvd* Typen in Bezug auf die Verwandtschaftslinien, in denen alle Isolate eingeteilt wurden. In diesem Diagramm war deutlich zu sehen, dass der abundanzstärkste Typ 1 in 4 von 5 Verwandtschaftslinien dominierte. Einzig in der Linie 1A hatte der Typ 2 die meisten Vertreter. In Linie 2A und 4 gab es nur den *mvd* Typ 1.

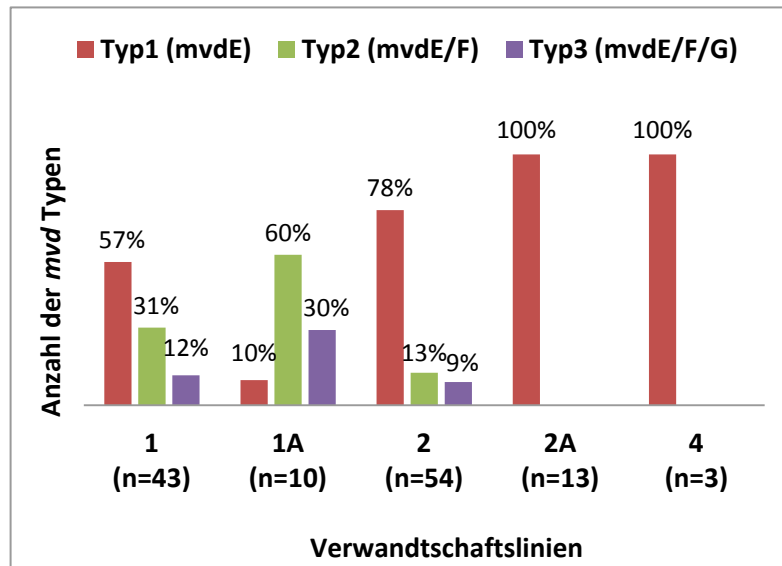


Abb. 39 Verteilung der *mvd* Typen auf die Verwandtschaftslinien

Die Tab. 12 gab einen Überblick der Verbreitung der Precursorgene bzw. Corepeptide auf die einzelnen Isolate in Abhängigkeit von den *P. agardhii* und *P. rubescens* Verwandtschaftslinien.

Tab. 12 Verbreitung der einzelnen Corepeptid Genotypen. ^a Isolat 354 wurde zu *mvd* Typ3 gezählt, aber es war nur mehr ein kleiner Sequenzrest des dritten Corepeptids vorhanden

Isolat	V. linie	Corepeptid	Isolat	V. linie	Corepeptid	Isolat	V. linie	Corepeptid	Isolat	V. linie	Corepeptid
31/1	1	T, M	976	1	N	403	2	AD, Z	1459/30	2	N
32	1	I, M	2A	1	I, M	405	2	W, AC, AA	1459/31	2	N
39	1	N	1459/15	1	S, M	406	2	W, AC, AA	1460/5	2	K, M
41	1	I, M	CYA126/8	1	K, M	549	2	AD, Z	PCC7821	2	N
63	1	I, M	PCC7805	1	N	550	2	W, AC, AA	757	2A	R
66	1	I, M	PCC7811	1	N	551	2	W, AC, AA	758	2A	R
79	1	N	SAG5.81	1	I, Q	761	2	N	763	2A	R
250	1	N	SAG6.89	1	U, Y	762	2	N	764	2A	R
251	1	N	277	1A	N	775	2	N	765	2A	R
252	1	N	364	1A	W, AC, N	776	2	N	766	2A	R
253	1	N	365	1A	W, AC, N	777	2	N	769	2A	R
254	1	N	371	1A	W, Z	778	2	N	770	2A	R
255	1	N	372	1A	W, Z	779	2	N	771	2A	R
256	1	N	384	1A	W, AC, N	804	2	N	772	2A	R
257	1	N	390	1A	W, Z	805	2	N	865	2A	R
259	1	AB, K, P	396	1A	W, Z	806	2	X, AA	873	2A	R
274	1	N	553	1A	W, Z	807	2	N	1459/36	2A	R
281	1	AB, K, P	557	1A	W, Z	808	2	X, AA	67	4	N
299	1	N	3	2	N	814	2	N	82	4	N
307	1	AB, K, P	40	2	R	815	2	V, Z	83/2	4	N
320	1	N	64	2	R	816	2	V, Z	NIES204	3	AB, K, M
354 ^a	1	W, AC	80	2	N	830	2	N			
394	1	V, Z	97	2	N	838	2	N			
554	1	W, AC, N	108	2	N	839	2	N			
759	1	N	110	2	N	840	2	N			
760	1	N	111	2	N	21-	2	N			
781	1	I, M	139	2	N	496/1	2	W, AC, AA			
782	1	N	145	2	N	91/1	2	N			
787	1	N	161	2	N	A7	2	N			
788	1	N	166	2	N	1459/11A	2	N			
790	1	N	169	2	N	1459/14	2	N			
828	1	N	170	2	N	1459/16	2	N			
829	1	I, M	178	2	N	1459/17	2	N			
836	1	N	260	2	N	1459/21	2	N			

3.5.3 Corepeptid Genotypen

Die folgende Tab. 13 beinhaltet auch die Sequenz des Corepeptides, das nach einigen posttranslationalen Modifikationen zum eigentlichen Microviridin wurde. Die Microviridine hatten eine Länge von 13 - 15 AS. Jene Isolate die dem Typ 2 oder Typ 3 zugeordnet wurden, waren somit zweimal bzw. dreimal mit dem jeweiligen Corepeptid in der Statistik geführt. Insgesamt gab es 176 Precursor in 123 positiven *mvd* Isolaten. Die Microviridine Q, S, T, U und Y waren jeweils nur einmal vertreten.

Tab. 13 Auflistung der Abundanzen der einzelnen Precursor Varianten mit den entsprechenden Corepeptide Sequenzen und den dazugehörigen Massen. ¹*mvdK* erstbeschrieben in Philmus et al 2008, ²*mvdI* erstbeschrieben in Fujii et al 2000; Die Werte in Klammern sind die möglichen deacetylierten Massen für Isolate ohne *mvdB* Gen (Act).

Precursor	Corepeptid	Masse (Da)	Häufigkeit
<i>mvdK</i> ¹	YGNTMKYPSDWEEY	1770	6
<i>mvdM</i>	TIWTFKWPSDWEDS	1785	12
<i>mvdN</i>	TIWTLKWPSDWEDS	1751 (1708)	72
<i>mvdI</i> ²	YPTTLKYPSDWEDY	1765	8
<i>mvdP</i>	TVWTFKWPSDWEDC	1787	3
<i>mvdQ</i>	IWTFKWPSDWEDS	1684	1
<i>mvdR</i>	TAWTLKWPSDFEDS	1670 (1627)	15
<i>mvdS</i>	ATTRKYPSDWEDY	1619	1
<i>mvdT</i>	GTTRKYPSDWEEW	1642	1
<i>mvdU</i>	YGSTYKYPSDWEDY	1761	1
<i>mvdV</i>	YANTMKYPSDWEEQF	1896 (1853)	3
<i>mvdW</i>	FDTRKFPSDWEDSW	1803	16
<i>mvdX</i>	FDTRKFPSDWEDW	1761	2
<i>mvdY</i>	VWTFKWPSDFEDS	1631	1
<i>mvdZ</i>	TVWTLKWPSDWEDS	1737 (1694)	11
<i>mvdAA</i>	VWTWKWPSDWEDS	1709	7
<i>mvdAB</i>	FSTYKYPSDFEDF	1633	4
<i>mvdAC</i>	FIGTYKYPSDFEDA	1640	10
<i>mvdAD</i>	FIGTYKFPSDFEDF	1700	2

Die nächste Darstellung zeigte die Verteilung der neun häufigsten Precursor Varianten, die mehr als fünfmal vorkamen.

Die Verwandtschaftslinie 1, 2 und 4 wurde von *mvdN* dominiert, wobei die Verwandtschaftslinie 4 mit nur drei Isolaten zu 100% *mvdN* aufwies. Auch alle Isolate der Verwandtschaftslinie 2A hatten nur einen Precursor, nämlich *mvdR*. Bei Verwandtschaftslinie 1A war der häufigste Precursor *mvdW* und *MvdI* kam nur in Isolaten aus der Verwandtschaftslinie 1 vor. Die Verwandtschaftslinie 1 + 2 hatten nicht nur die höchste Stichprobenanzahl, sondern auch die größte Varianz an Precursor.

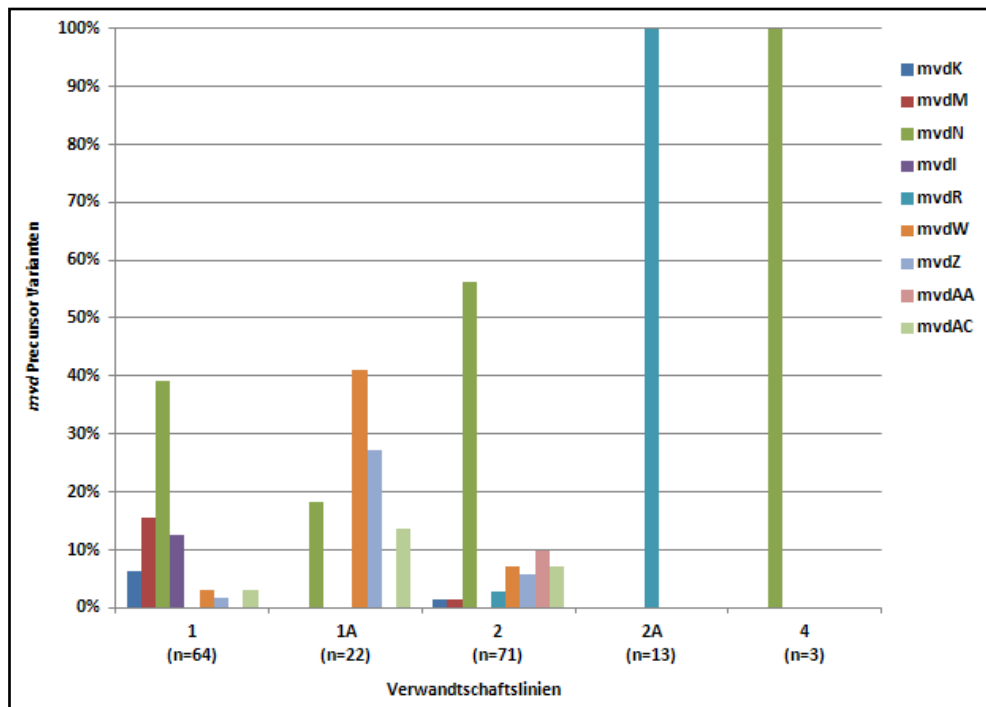


Abb. 40 Verteilung aller *mvd* Precursor Varianten auf die Verwandtschaftslinien

Es wurden nur die häufigsten Corepeptid Genotypen verglichen (≥ 5).

Weiters wurde auch versucht mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS) die Microviridine in den einzelnen Isolaten nachzuweisen, um zu wissen wieviele Microviridine tatsächlich realisiert wurden (Tab. 14). Zur Berechnung der Corepeptid Masse (in Dalton, Da) wurde die online Software Isotopident verwendet. Von der berechneten Masse wurde dann noch 54 Da abgezogen, weil drei Wassermoleküle durch den tricyclischen Aufbau des Microviridins verloren gehen. Wenn in dem jeweiligen Isolat das *mvdB* Gen vorhanden war (Tab. 10), dann konnte man von einer Acetylierung des Microviridins ausgehen und in diesen Fällen müsste man noch 43Da addieren. Es wurde ungefähr ein Drittel der möglichen Microviridine in den Isolaten nachgewiesen.

Tab. 14 LC/MS nachgewiesene Microviridine. ^a sollten eigentlich acetyliert sein mit einer Masse von 1751 Da, ^b die berechnete Masse wäre 1619 Da gewesen, ^c die berechnete Masse wäre 1642 Da gewesen, ^d deacetylierte Form

Precursor	Masse (Da)	Isolat
<i>mvdK</i>	1770.6	259, 281, 307, 126/8, 1460/5
<i>mvdN</i>	1707.9	775, 777, 779, 839, 804, 830, 838, 840, 776, 778, 83/2 ^a , A7 ^a , 111 ^a , 108 ^a
<i>mvdI</i>	1765.3	2A, SAG5.81, 66, 41, 781, 829
<i>mvdP</i>	1787.3	259
<i>mvdQ</i>	1684.3	SAG5.81
<i>mvdR</i>	1627.4	757, 763, 764, 766, 770, 771, 769, 765, 758
<i>mvdS</i>	1620.4	1459/15 ^b
<i>mvdT</i>	1643.8	31/1 ^c
<i>mvdW</i>	1803.3	384, 550
<i>mvdX</i>	1716.6	806
<i>mvdZ</i>	1737.3	371, 372, 557
<i>mvdZ</i> ^d	1694.3	815, 816
<i>mvdAA</i>	1709.3	405, 406, 550, 551, 496/1, 808, 806
<i>mvdAB</i>	1633.3	259, 281, 307
<i>mvdAC</i>	1640.3	354, 364, 384, 405, 406
<i>mvdAD</i>	1700.5	403

Die LC/MS Messung wurden von Dr. Judith Blom (Limnologische Station, Universität Zürich) durchgeführt. Die Microviridine M, U, V und Y konnten in keinem der Isolate mit dem vorhandenen Precursorgen nachgewiesen werden.

3.5.4 Leaderpeptid Genotypen

Die verschiedenen Precursorgene konnte man nicht nur am Corepeptid unterscheiden, sondern auch am Leaderpeptid. Die Variation bei den Leaderpeptiden war nicht so groß wie bei den Corepetiden. Es gab eine klare Dichotomie, die die Leaderpeptide in eine sogenannte VEAN- und eine TET Gruppe einteilte, aufgrund der Unterschiede in der AS Sequenz (Tab. 15). Die Leaderpeptid Sequenzen waren größtenteils konserviert, mit nur einigen Punktmutationen. Aus der Tab. 15 war ersichtlich, dass ein Leaderpeptid mit unterschiedlichen Corepeptiden vorkommen kann, aber nicht umgekehrt. Es gab nur zwei Ausnahmen bei dem TET Leader mit dem Microvirin N und AA. Das Microvirin N hatte bei den Isolaten 67 (Wörthersee, AT) und 166 (Grabensee, AT) jeweils einen anderen TET Leader mit einer Punktmutation. Das Microvirin AA hatte in den Isolaten 808+806 (Winnecook Lake, US) ebenfalls

einen eigenen TET Leader. In der Tab. 15 war weiters noch die Häufigkeit der einzelnen Leaderpeptid Varianten angegeben.

Tab. 15 Varianten und Häufigkeit der Leaderpeptide mit den vorkommenden Corepeptiden

Leaderpeptid	Corepeptid	Häufigkeit (n=176)
VEAN		
MSKNVKVSAP T AVPFFARFLAEQAVEANNSNSAP	U	1x (SAG6.89)
MSKNVKVSAP K AVPFFARFLAEQAVEANNSNSAP	AB, K, V, I, T, S	13%
MSKNVKVSAP K AVPFFARFLAEQAVEANSSNSAP	W, X	10%
MSKNVKVSAP K AVPFFARFLAEQAVEANSSNSTP	AC, AD	7%
TET		
MSKNIKVSTGS A V P FFARFLSEQDTETGDSTSTDIP	N, P, M, Q	49%
MSKNIKVSTGS A V P FFARFLSVQDTETGDSTSTDIP	N	1x (67)
ISKNIKVSTGS A V P FFARFLSEQDTETGDSTSTDIP	N	1x (166)
MSKNIKVSTGS A V P FFARFLSEQDTETGGSTSTDIP	Y	1x (SAG6.89)
MSKNIKVSTGS A V P FFARFLIEQDTETGDSTSTDIP	Z	6%
MSKNIKVSTGL A V P FFARFLTEQDTETGDSTSTDIP	AA	3%
MSKNIKVSTDL A V P FFARFLTEQDTETGDSTSTDIP	AA	2x (806+808)
MSKNIKVSTGL A V P FFARFLSEQDTETGGPTSTDFP	R	9%

Diese zwei Leader Varianten konnte man auch wieder auf die Verwandtschaftslinien aufteilen. In dieser Darstellung war der TET Leader in den Verwandtschaftslinien 1 und 2 am häufigsten vertreten und in den Verwandtschaftslinien 2A und 4 war nur der TET Leader vorhanden. Einzig in der Verwandtschaftslinien 1A war der VEAN Leader etwas häufiger. Insgesamt war der TET Leader in toxischen bzw. inaktiven Isolaten (V.linie 2 und 2A) am häufigsten vertreten.

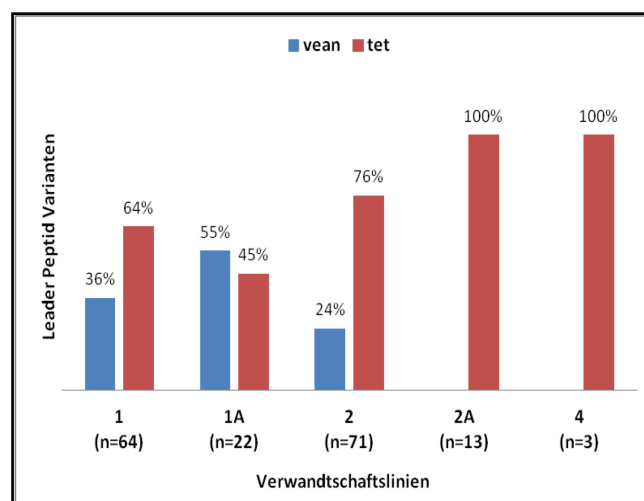


Abb. 41 Verteilung der Leaderpeptid Varianten auf die Verwandtschaftslinien

3.5.5 Detektion von Rekombinationen im Bereich der Precursorpeptid Genotypen

Bei diesem etwas größeren *mvd* Typ 1 Isolaten handelte es sich um die *mvd* Precursor Variante *mvdR*, die ein zusätzliches Insert von 69bp aufwies. Dieses Insert war in allen 15 Isolaten mit dem *mvdR* Precursor vorhanden. Zusätzlich wurde es in allen Isolaten mit *mvd* Typ 2 und 3 Precursor Varianten nachgewiesen. Einzig in den Typ 1 Isolaten mit dem *mvdN* Precursor wurde dieses Insert nicht gefunden (Abb. 42).

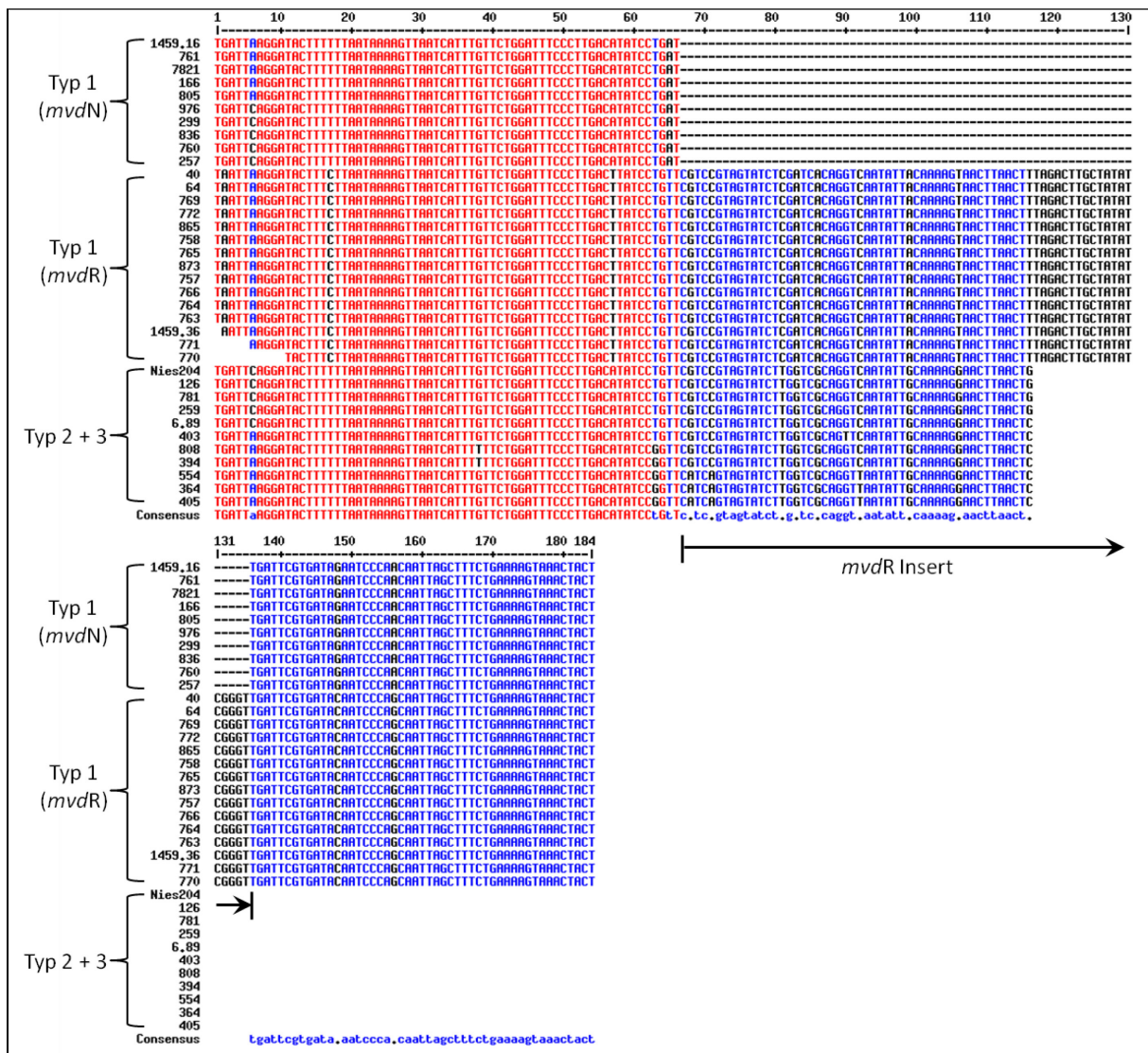


Abb. 42 Alignment der IGS Region von *mvdD/mvdE*

Für diesen MultAlin Sequenzvergleich wurde der intergenische Bereich zwischen *mvdD* und *mvdE* herangezogen. Es wurde zur besseren Veranschaulichung dieser Abbildung nicht alle Isolate miteinbezogen, da die Sequenzübereinstimmung ohnehin sehr groß ist. Für das Alignment wurden Isolate ausgesucht, die das gesamte Verbreitungsgebiet (Europa, Asien und N - Amerika) der Microviridine abdecken.

Alle 15 Typ 1 (*mvdR*) Sequenzen hatten das komplette 69bp große Insert in der IGS Region ohne einer einzigen Punktmutation. Bei den Typ 2 + 3 Isolaten war ein Großteil des Inserts vorhanden, der Rest ging verloren. Interessant war dabei, dass die Sequenzen bei allen Isolaten an der gleichen Position abbrach. Bei den Typ 1 (*mvdN*), der am häufigsten vertretenen Gruppe, fehlte dieses Insert komplett.

Weiters war bei diesem Alignment der IGS Region aller Typen zu sehen, dass die vorhandenen Punktmutationen durchgehend an der gleichen Position auftraten.

Neben dem fehlenden Insert in den Typ 1 (*mvdN*) Isolaten wurde ein weiterer Größenpolymorphismus bei den Stämmen 806 und 808 (Winnecook Lake, US) entdeckt (Abb. 43).

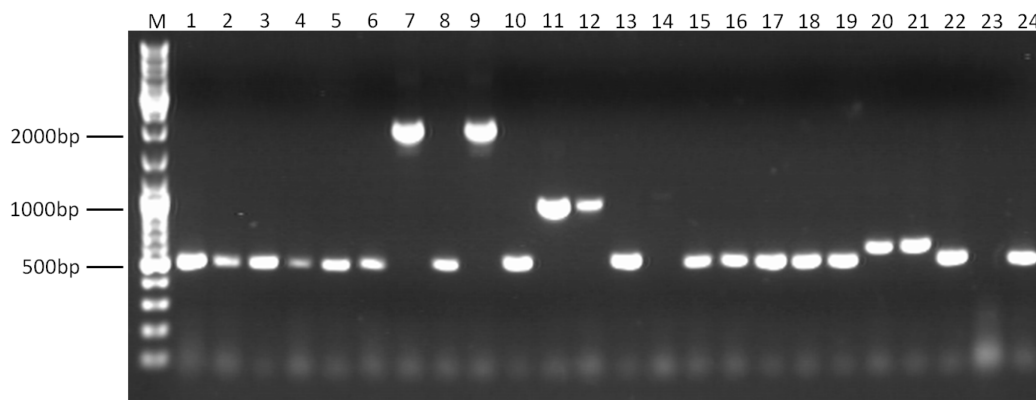


Abb. 43 *mvd* Precursor PCR mit Spezialfall. Marker GeneRuler DNA Ladder Mix

Auf den Bahnen 7 und 9 mit ca. 2kb waren diese Stämme 806 und 808 zu sehen. Durch die Sequenzierung wurde ein zusätzliches Protein aus der Epsilon/Zeta Toxin Familie (Toxin – Antitoxin System, Mutschler et al 2011) entdeckt, das zwischen *mvdE* und *mvdF* gesprungen ist. Dieses Protein war bei beiden Isolaten im Vergleich zu den *mvd* Precursorgenen in antisense Richtung ins Genom integriert. Flankiert wurde das Protein von einer unspezifischen Sequenz in der IGS Region zu *mvdF* und einem ABC Transporter in der IGS Region zu *mvdE* (Abb. 44). Insgesamt machte das Insert mit dem Protein und den flankierenden Sequenzen ca. 1060bp aus.

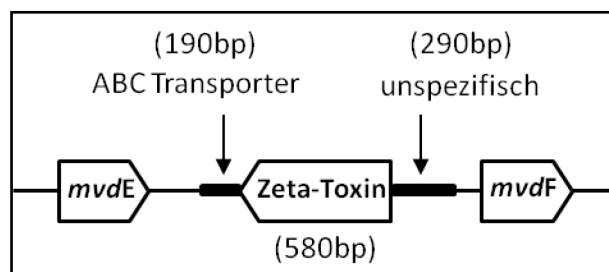


Abb. 44 Protein Insert aus der Zeta Toxin Familie bei den Isolaten 806 +808 (Winnecook Lake, US)

Bei der Sequenzanalyse wurde in der IGS Region der einzelnen Precursorgene ein Sequenzabschnitt entdeckt, der bei allen Typen und Isolaten, bis auf einzelne Punktmutationen identisch war. Dieser Abschnitt begann direkt nach dem jeweiligen Stopcodon der *mvd* Precursor Gene und umfasste 74bp (Abb. 45).

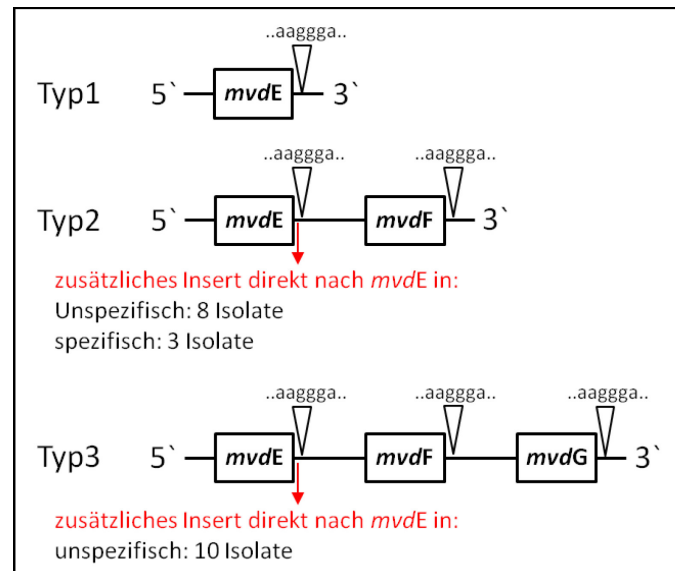


Abb. 45 Wiederholung eines Sequenzabschnittes in der IGS Region der Precursorgene

Weiters wurde zur Veranschaulichung ein Alignment des sich wiederholenden Sequenzabschnittes gemacht. Es wurden jeweils nur drei *mvd* Typ 1, Typ 2 und Typ 3 Isolate für den Vergleich ausgesucht (Abb. 46). Dabei wurde auch darauf geachtet, dass das gesamte Verbreitungsspektrum mit Isolaten aus Europa, Asien und N-Amerika abgedeckt ist.

	1	10	20	30	40	50	60	70	74
307.1	ATAGATAAGAGCAATCTTATCCCAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
384.2	ATAGATAAGAGCAATCTTATCCCAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
Nies204.1	ATAGATAAGAGCAATCTTATCCCAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
815.1	ATAGATAAGAGCAATCTTATCCCAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
1459/15.1	ATAGATAAGAGCAATCTTATCCCAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
829.1	ATAGATAAGAGCAATCTTATCCCAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
384.1	ATAGATAAGAGCAATCTTATCCCAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
307.2	ATAGATAAGAGCAATCTTATCCCAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
Nies204.2	ATAGATAAGAGCAATCTTATCCCAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
307.3	GTAGACAGAGCCATCTTGATCGAAATT-AAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
771	GTAGACAGAGCCATCTTGATCGAAATT-AAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
772	GTAGACAGAGCCATCTTGATCGAAATT-AAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
815.2	GTAGACAGAGCCATCTTGATCGAAATT-AAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
790	GTAGACAGAGCCATCTTGATCGAAATT-AAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
166	GTAGACAGAGCCATCTTGATCGAAATT-AAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
1459/15.2	GTAGACAGAGCCATCTTGATCGAAATT-AAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
384.3	GTAGACAGAGCCATCTTGATCGAAATT-AAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
829.2	GTAGACAGAGCCATCTTGATCGAAATT-AAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
Nies204.3	GTAGACAGAGCCATCTTGATCGAAATT-AAGGGAGTAGCAGTTATTTAATACTAAAGCTACTCCCTATTT								
Consensus	aTAGAtaAGAGCaATCTTaATCgaAATT.AAGGGAGTAGcAGTTATTTAATACTaAAAGCTACTCCCTATTT								

Abb. 46 Alignment der sich wiederholenden Sequenz in der IGS Region

Bei diesem Alignment war zu erkennen, dass dieser Abschnitt in der IGS Region relativ gut konserviert war, trotz der unterschiedlichen Precursor Varianten in den einzelnen Isolaten. Wenn man im Speziellen die Punktmutationen an der Basenposition 1, 6-7 und 19 betrachtete, dann konnte man eine Dichotomie der Sequenzen feststellen.

Auf der Abb. 45 waren auch einige Isolate aufgelistet, die ein zusätzliches Insert vor der repetitiven Sequenz aufwiesen. Dieses Insert hatten nur *mvd* Typ 2 und Typ3 Isolate und auch nur jeweils einmal direkt nach dem Precursorgen *mvdE* (am 3'Ende). Dabei handelte es sich um eine unspezifische Sequenz, die in folgenden Stämmen zu finden war: 354, 364, 365, 384, 371, 372, 390, 396, 553, 554, 557 (Moose Lake, CA); 405, 406, 496.1, 550, 551 (Moore Lake, CA); 806 und 808 (Winnecook Lake, US). Dieses unspezifische Insert war in allen Isolaten komplett identisch ohne einer einzigen Punktmutation: „AGACGTCGCCAGATATAAATAGAGTCGCACCTACTACAACTCGGAAGTATCCTTGCGATTTGGAAGATTTTAA“.

Bei der Suche in der NCBI Datenbank mittels xblast wurde diese Sequenz einem hypothetischem Protein in Cyanothece PCC7822 zugewiesen.

Nun gab es auch noch drei Isolate (394, Moose Lake CA; 815 und 816, China Lake US), die ein spezifisches Insert vor der repetitiven Sequenz hatten (Abb. 45). Diese Isolate wurden zu dem *mvd* Typ 2 gezählt mit den Precursoren V und Z. Bei diesem spezifischen Insert handelte es sich um ein Genrest des Precursors AC. Das eigentliche Corepeptid war vollständig erhalten und das Leaderpeptid bestand nur mehr aus sieben Aminosäuren (Abb. 47).

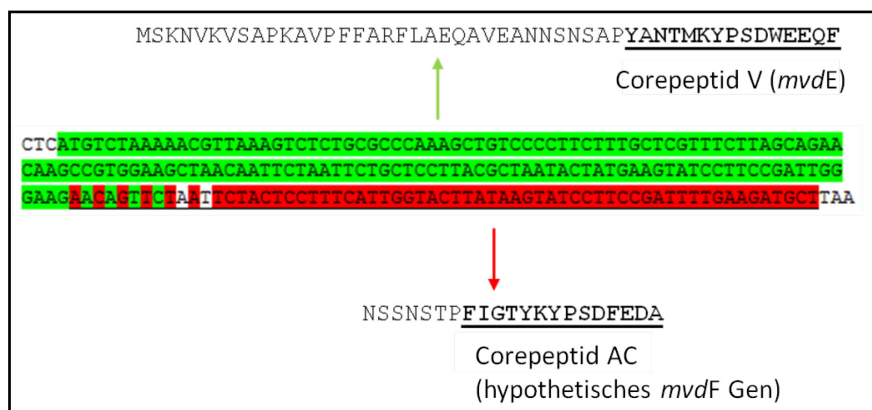


Abb. 47 Überreste des Precursorgens AC in den Isolaten 394 (Moose Lake, CA), 815 und 816 (China Lake, US)

Das Ende des Corepeptids von Precursors V (*mvdE*), inklusive Stopcodon (TAA) überschneidet sich mit dem Genrest des Leaderpeptids von Precursor AC. Dabei teilen sie sich folgende Basen der rot-grünen Schraffierung „(G)AACAGTTCTAAT. Durch einen Frameshift bei der Translation von Base G hin zu Base A konnten diese folgenden vier AS „NSSN“ übersetzt und dem Leaderpeptid von Precursor AC zugewiesen werden.

3.6 Mutagenese

Die erfolgreich transformierten Cyanobakterien Zellen des Stammes NIVA CYA 126/8 mit dem *mvd* Konstrukt sollten unter dem Selektionsdruck des Antibiotikums Chloramphenicol überleben, sich teilen und es sollte wieder eine deutlich tiefgrüne Kultur entstehen. Die restlichen Zellen waren schon abgestorben, nur die erfolgreichen Transformanten sollten überleben.

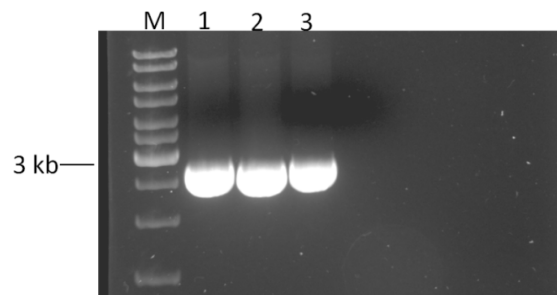


Abb. 48 Check PCR. 1: Wild Typ, 2: *mvdC* KO, 3: *mvdD* KO; Marker GeneRuler DNA Ladder Mix

Wie erwartet kam es durch Zugabe von Cm zum Absterben der Zellen und Ausbleichen der Kultur. Tatsächlich wurde nach 6 Monaten ein erneutes Ergrünen der Kultur festgestellt, was durch das Wachstum eines erfolgreich transformierten Genotypen bedingt sein hätte können. Die Check PCR zur Überprüfung der erfolgreichen Mutagenese wurde mit dem selben Primerpaar (*mvdCD* KO+/-) wie zur Konstruktherstellung, durchgeführt. Die PCR Produkte der genmanipulierten Isolate wurden parallel mit dem Wild-Typ über Gelelektrophorese verglichen. Bei erfolgreicher homologen Rekombination und Aufnahme der Cm Resistenzkassette ins Genom sollten das PCR Produkt eine um ca. 1 kb größere Bande aufweisen. Da die beiden *mvd* Gene aber gleich groß wie der Wild Typ waren, kam es zu keiner Insertion der Cm Resistenzkassette ins Genom. Folglich handelte es sich bei der wieder ergrünten Kultur um Wildtypzellen, die dem Selektionsdruck durch das Antibiotikum entkommen waren.

4 Diskussion

4.1 Verbreitung der verschiedenen Peptidgencluster

Die Ergebnisse dieser Suche haben gezeigt, dass beinahe alle *P. agardhii* und *P. rubescens* Isolate mindestens fünf Peptidgencluster aufweisen. Es handelt sich dabei um die Peptidgencluster zur Synthese häufiger bioaktiver Peptide, nämlich um die nicht-ribosomal synthetisierten Aeruginosine, Anabaenopeptine, Cyanopeptoline und die ribosomal synthetisierten Peptide Microviridin und Planktocyclin. Der Gencluster des Hepatotoxin Microcystin ist nur mehr bei ca. der Hälfte der untersuchten Isolate gefunden worden. Der seltene Microginin Gencluster ist nur 11 mal detektiert worden. Da dieser Gencluster bei *Planktothrix* offensichtlich so selten ist, kann man auch nicht viel über dessen Verbreitung sagen und es ist auch nicht nach eventuellen Genresten gesucht worden. Man kann nicht ausschließen, dass einzelne Polymorphismen in den einzelnen Peptidgenclustern übersehen wurden, da ja nicht alle Genregionen eines Genclusters überprüft wurden, sondern einzelne charakteristische Gene nachgewiesen wurden.

Im Gegensatz dazu fehlen diese Peptidgencluster bei der tropischen Art *P. pseudagardhii* praktisch komplett. Allerdings konnten Genreste des Microcystingenclusters eindeutig nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die beobachtete Verbreitung der Peptidgencluster vor allem genetisch determiniert ist. Die Arten *P. agardhii* und *P. rubescens* sind zueinander näher verwandt als zur tropischen Art *P. pseudagardhii*. Es wird daher angenommen, dass bereits der gemeinsame Vorfahre von *P. agardhii*/*P. rubescens* diese fünf verschiedenen Gencluster im Genom hatte.

4.2 Verlust von Peptidgenclustern

Die Suche nach den Genresten mittels spezifischen Primern oder der Genome Walking Methode haben gezeigt, dass sehr oft, wenn die Präsenz eines Genclusters nicht bestätigt werden konnte, Reste gefunden werden. So konnte der Verlust des Microcystingenclusters für die tropische Art *P. pseudagardhii* bestätigt werden. Die verwendeten Primer amplifizierten sowohl das Gen am 5' Ende (*mcyT*) als auch einen Teil der IGS Region 5' vor *mcyT*. Wie bereits bei Christiansen et al 2008, sind auch für *P. pseudagardhii* und sogar die Gattung *Geitlerinema* fast idente Sequenzreste gefunden worden. Bei dem *P. pseudagardhii* Isolat 713 (aus Afrika, Uganda) ist ein kurzes Insert in der *mcyT* Region entdeckt worden (ca. 100 bp), das identisch mit der Sequenz aus *P. rubescens* Stamm NIVA-CYA 98 ist (Rounge et al 2009). Dies ist ein Hinweis, dass der Microcystingencluster schon sehr alt ist, und wahrscheinlich bei vielen Arten im Laufe der Evolution verloren gegangen ist (Rantala et al 2004). Nachdem einzelne Gene des Microcystingenclusters (z.B. *mcyD* oder *mcyE*) im Vergleich zu „housekeeping genes“ wie 16S rDNA oder RNA Polymerase idente Stammbäume ergeben, wurden von Rantala et al. (2004) indirekt die Hypothese aufgestellt, dass der Microcystingencluster auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgeht, der vor 2 Milliarden Jahren existierte. Übereinstimmend wurden in dieser Arbeit idente Genclusterreste nicht nur innerhalb der nah verwandten Arten *P.*

agardhii/rubescens, sondern auch entfernter verwandten Arten wie *P. pseudagardhii* und sogar Arten aus anderen Gattungen wie *Geitlerinema* festgestellt. Erstaunlich ist hierbei, dass dieser *mcyT* Rest und die angrenzende IGS Region über einen wahrscheinlich relativ langen Zeitraum der Evolution praktisch unverändert geblieben sind.

Weiter konnte der Verlust des Anabaenopeptin und des Cyanopeptolingenclusters für *P. agardhii* bestätigt werden. Der Anabaenopeptingencluster ist bei 15 Isolaten verloren gegangen. Interessanterweise konnte durch das Genome Walking bei dem Isolat 976 (US, Tucson) das gleiche IS-Element ISPlag1 nachgewiesen werden, das nach Christiansen et al. (2008) bereits zum Verlust des Microcystingenclusters beigetragen hat. Der zweite Stamm 257 (ESP, Albufera) bei dem der Verlust des Anabaenopeptingenclusters untersucht worden ist, wurde allerdings von einem zweiten (unbekannten IS Element) inaktiviert. Dies bedeutet, dass der Anabaenopeptingencluster zumindest zweimal wiederholt durch Deletion verloren gegangen ist.

Weiters konnte in der Überbrückungsregion zwischen den benachbarten Genclustern für Anabaenopeptin und Cyanopeptolin ein weiteres unbekanntes IS-Element entdeckt werden. Diese Insertion könnte in der Tat eine Art Vorstufe zu einem künftigen Verlust des Anabaenopeptin oder Cyanopeptolin Genclusters sein. Nachdem die IS Elemente repetitive Genregionen beinhalten, kann es nach der Vorstellung von Christiansen et al. (2008) zu site-spezifischen Rekombinationsereignissen kommen, wobei analog zur Exzision des Phagen Lambda die Peptidgencluster während der Amplifikation der DNA aus dem chromosomalen DNA Strang ausgeschnitten werden.

4.3 Lokalisation und Funktion des Multipeptidgencluster

Die benachbarte Anordnung von drei Peptidgencluster (Microviridin, Anabaenopeptin und Cyanopeptolin) ist bei der großen Mehrheit der *P. agardhii/rubescens* Isolate bestätigt worden. Die Ausnahme bilden jene Stämme die den Anabaenopeptin bzw. Cyanopeptolingencluster verloren haben. Dieser Multipeptidgencluster ist ca. 60 kb groß und es ist wahrscheinlich, dass diese Anordnung nicht durch Zufall entstanden ist. Aufgrund der relativ guten Konservierung dieser Multipeptidgencluster Struktur, kann man vermuten, dass die Synthese von drei verschiedenen Peptidklassen einen selektiven Vorteil mit sich bringt. Von allen drei Peptidklassen sind einzelne bioaktive Peptide als Protease Inhibitoren beschrieben worden. Von diesen Proteaseinhibitoren wird angenommen, dass sie die Verdauungsenzyme von verschiedenen Fressfeinden inhibieren und dadurch zur chemischen Verteidigung beitragen (von Elert et al. 2004). Beispiele aus der aquatischen Ökologie zeigen, dass dabei ein „Cocktail“ von bioaktiven Verbindungen effektiver wirkt als die Einzelkomponenten. Gleichzeitig können mehrere verschiedene inhibitorische Peptide durch den Fraßfeind, z.B. *Daphnia* schwieriger umgangen oder ausgeglichen werden als die Einzelkomponenten (von Elert et al 2004).

Eine Theorie zur Vererbung bzw. Weitergabe könnte sein, dass diese Peptide zusammen als Packet durch horizontalen Gentransfer weitergegeben werden und sich dieser Multipeptidgencluster aufgrund eines evolutionären Vorteils durchgesetzt hat.

4.4 Funktionelle Rekombinationen im Microviridin Gencluster

Für das ribosomal synthetisierte Depsipeptid Microviridin sind zwei funktionelle Rekombinationen im Gencluster entdeckt worden. Die eine betrifft das Gen *mvdB*, das für eine Acetyltransferase codiert und die zweite Rekombinationen im Bereich der Precursorgene.

Das *mvdB* Gen ist für die Acetylierung der N-terminalen Aminosäure an Position 1 verantwortlich und ist bei zwei Microviridin Varianten als funktionell beschrieben. Bei den zwei acetylierten Microviridinen handelt es sich um Microviridin I (Fujii et al 2000) und Microviridin K (Philmus et al 2008).

In dieser Arbeit wurde nur knapp ein Viertel (24 %) der Isolate gefunden, die kein *mvdB* Gen besitzen. Es könnte sein, dass diese Acetylierung die Microviridin Struktur stabilisiert und es vor Abbau schützt. Dieser evolutionäre Vorteil könnte dazu führen, dass es in Zukunft einen noch stärkeren Trend zur Acetylierung gibt.

Für die Microviridingencluster ohne das *mvdB* Gen wurden allerdings keine Reste von *mvdB* gefunden. Den indirekten Beweis hierfür lieferte die Sequenzierung der IGS Region von einigen *mvdB* negativen Isolaten. Ein Alignment dieser Sequenzen zeigte eine beinahe 100% ige Übereinstimmung, was gegen einen Verlust durch z.B. IS Elemente spricht, da es unwahrscheinlich ist, dass ein Gen immer auf die Base genau gleich herausgeschnitten wird.

Die Theorie zum Erwerb dieses *mvdB* Gens wäre daher, dass es nicht von Beginn an Teil des Microviridingencluster war, sondern einmal durch ein Rekombinationsereignis erworben und beibehalten wurde. Ein Hinweis für diese Theorie ist, dass beinahe alle Isolate (mit einer Ausnahme Stamm 277) der Verwandtschaftslinie mit den toxischen Stämmen von *Planktothrix* (Linie 2, 2A) angehören. Der Vorläufer dieser Linie hätte also dieses *mvdB* Gen horizontal erworben. Beim Microcystingencluster existiert ein ähnliches Beispiel für eine funktionelle Rekombination einer Adenylierungsdomäne im *mcyA* (Kurmayer et al. 2005), die zur Folge hat, dass bei dem Microcystinmolekül entweder N-Methyl-Dehydroalanin (Mdha) oder Dehydrobutyrin (Dhb) an Position 7 eingebaut wird.

Die größte Variation im Microviridingencluster findet sich allerdings bei den Precursorgenen, die für ein Prä-Peptid codieren. Die Variation betrifft nicht nur die Anzahl der Precursor, sondern auch deren Aminosäuresequenz. Die Anzahl dieser neu gefundenen putativen Microviridin Varianten würde die Zahl z.B. der Anabaenopeptin oder Microcystin Strukturvarianten deutlich übersteigen. Generell geht man davon aus, dass eine hohe Strukturvielfalt von möglichen bioaktiven Sekundärmetaboliten von Vorteil ist, weil dadurch neue effektive Substanzen bei Selektionsdruck entstehen können (Firn & Jones 2000). Die Autoren behaupten, dass es für einen Organismus wichtig ist, ein flexibles System

zur Herstellung von Sekundärmetaboliten zu besitzen. Im Fall von Microviridin oder Planktocyclin würde eine höhere Anzahl an Precursorgen auch zu einer erhöhten Strukturdiversität führen. In der Tat wurden bei einzelnen Isolaten Hinweise für die Produktion mehrerer Microviridinvarianten gefunden. Beim zweiten ribosomal produzierten Peptid, dem Planktocyclin wurde sogar, bis zu sieben Precursor Gene im Gencluster gefunden (Donia & Schmitt 2008). Daher könnte man sich schon vorstellen, dass die Zahl der Precursorgene auch beim Microviridin im Zunehmen ist.

Die überwiegende Mehrheit (2/3) der Isolate weisen allerdings nur einen Precursor auf. Innerhalb dieser Gruppe ist die Variation schon relativ gering, denn es gibt nur zwei verschiedene Corepeptide, dh. zwei verschiedene Microviridinstrukturvarianten. Bei den Isolaten, die zwei oder drei Precursor aufweisen, ist die potentielle Strukturvariation mit 17 verschiedenen Corepeptiden deutlich höher. Diese Typ 2 und 3 Microviridin Isolate kommen vermehrt bei der nicht-toxischen Linie von *Planktothrix* (Linie 1, 1A) vor. Die Wirkung als Protease Inhibitor der Microviridine zum Fraßschutz könnte bei der Produktion von mehreren Microviridinen verstärkt werden.

Nachdem es sehr wichtig ist, zu wissen, ob die einzelnen Microviridin Varianten auch tatsächlich produziert werden, wurde versucht, die Microviridine durch chromatographische-massenspektrometrische Verfahren (LC/MS) nachzuweisen. Nachdem die Struktur der Microviridine aufgrund der Aminosäuresequenz und der bekannten posttranslationalen Veränderungen eindeutig vorhergesagt werden kann, ist es möglich nach diesen mittels LC/MS zu suchen. Diese sehr spezifische Vorhersage stellt im Vergleich zu den NRPS einen entscheidenden Vorteil dar.

Interessanterweise konnte nur ca. 1/3 der putativen Microviridine in den einzelnen Isolaten detektiert werden. Bei manchen Isolaten wie 259, 281, 307, 384, 405, 406, 550 oder SAG 5.81 wurden allerdings sogar zwei bzw. drei Microviridine anhand ihrer Massevorhersage detektiert. Es sind jedoch weitere Arbeiten notwendig, um herauszufinden, warum in vielen Stämmen die entsprechenden Microviridine nicht detektiert worden sind. Eine Ursache dafür könnte sein, dass Microviridine aufgrund ihrer Polarität (z.B. im Unterschied zum negativ geladenen Microcystinmolekül) schlecht ionisierbar sind und deswegen ihre Masse in der LC/MS kaum detektierbar ist. Es könnte aber auch sein, dass einzelne Gene im Microviridincluster durch Punktmutationen ausgeschaltet sind oder dass die Synthese des Microviridins durch bestimmte Umweltbedingungen reguliert wird.

Die Precursorgene kann man nicht nur anhand ihrer Corepeptide unterscheiden, sondern auch anhand ihrer Leaderpeptide (Abb. 9). Bei den Leaderpeptiden zeigte sich aufgrund zweier charakteristischer Core-Motive eine deutliche Zweiteilung, und zwar in eine sogenannte „VEAN“ bzw. „TET“ Gruppe. Eine Theorie besagt, dass das Leaderpeptid als Erkennungssequenz für eine noch unbekannte Peptidase fungiert. Diese Peptidase hat die Aufgabe, das Microviridin Peptid nach den posttranslationalen Veränderungen durch die in *mvdC* und *mvdD* codierten GRASP Ligasen (Zyklisierung durch die beiden Esterbindungen und der Amidbindung) abzuspalten (Oman & van der Donk 2009).

In dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass ein bestimmter Corepeptidgenotyp immer spezifisch mit einem bestimmten Leaderpeptid vorkommt. Umgekehrt haben einzelne Leaderpeptidgenotypen immer mehrere verschiedene Corepeptidgenotypen. Die Funktion dieser Leaderpeptidregion ist jedoch sehr wenig erforscht, sodass gegenwärtig keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob ein bestimmtes Leaderpeptid Motif funktionelle Bedeutung für die Synthese eines bestimmten Corepeptids hat.

Zuletzt stellt sich die Frage, wie es zu der unterschiedlichen Anzahl an Precursorgen in den einzelnen Stämmen gekommen sein könnte. Hatte der Microviridingencluster schon von Anfang an drei Precursorgene und es kam in Laufe der Evolution zu einer Reduktion oder kam es zu mehreren Rekombinationen, die durch Punktmutationen zu neuen Varianten evolviert sind. Nach einer weiteren Theorie, könnten Duplikationen des Precursorgens ebenfalls die Anzahl erhöhen.

Gegen die Duplikation spricht die Tatsache, dass der Typ 2 immer ein Leaderpeptid der VEAN und der TET Gruppe aufweist und die Typ 1 Isolate haben immer nur ein TET Leaderpeptid. Woher kommt also das VEAN Leaderpeptid? Einzig bei Typ 3 mit zwei VEAN Leaderpeptiden kann man sich eine Duplikation eines Precursor aus dem Typ 2 heraus vorstellen.

Es wäre natürlich auch möglich, dass die zusätzlichen Precursorgene durch Rekombination oder horizontalem Gentransfer in den Microviridingencluster aufgenommen wurden. Dies könnte vielleicht auch die Herkunft des VEAN Leaderpeptids erklären. In der Tat wurden bei den IGS Regionen zwischen den Precursorgen kurze repetitive Sequenzen gefunden, die eine site-spezifische Rekombination ermöglichen könnten (Abb. 45). Ebenfalls wurden bei den Isolaten mit nur einem Precursorgen in Abhängigkeit vom jeweiligen Corepeptid (N oder R) spezifische Insertionen gefunden, die ebenfalls eine Rekombination anzeigen (Abb. 42).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwar Hinweise auf funktionelle Rekombinationen innerhalb des Microviridingenclusters gefunden wurden (z.B. *mvdB* oder Precursorgene), für den gesamten Gencluster selbst jedoch keine Hinweise auf horizontalen Transport innerhalb der Gattung *Planktothrix* vorliegen.

5 Literatur

- An, J., Carmichael, W.W. (1994). Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins, *Toxicon* 32: 1495-1507
- Anagnostidis, K., Komarek, J. (1988). Modern approach to the classification system of cyanophytes, 3-Oscillatoriales, *Arch. Hydrobiol. Algol. Stud.* 50-53: 327-472
- Baumann HI, Keller S, Wolter FE, Nicholson GJ, Jung G, Süssmuth RD, F J (2007) Planktocyclin, a cyclooctapeptide protease inhibitor produced by the freshwater cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *J Nat Prod* 70:1611-1615
- Blom, J. F., Bister, B., Bischoff, D., Nicholson, G., Jung, G., Süssmuth, R. D., & Jüttner, F. (2003). Oscillapeptin J, a New Grazer Toxin of the Freshwater Cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Journal of natural products*, 66(3), 431-434
- Burja AM, Banaigs B, Abou-Mansour E, Burgess JG, Wright PC (2001) Marine cyanobacteria - a prolific source of natural products. *Tetrahedron* 57:9347-9377
- Campbell, Neil A. (2003, 6.Auflage) *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, ISBN-10: 3827413524
- Carmichael WW (1992) Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *J Appl Bacteriol* 72:445-459
- Chorus I, Falconer IR, Salas HJ, Bartram J (2000) Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 3:323-347
- Christiansen, G., Fastner, J., Erhard, M., Börner, T., Dittmann, E. (2003). Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution, and manipulation, *Journal of Bacteriology* 185(2): 564-572
- Christiansen, G., Kurmayer, R., Liu, Q., Börner, T. (2006). Transposons inactivate biosynthesis of the nonribosomal peptide Microcystin in naturally occurring *Planktothrix* spp., *Appl. Env. Microbiol.* 72
- Christiansen, G., Philmus, B., Hemscheidt, T., & Kurmayer, R. (2011). Genetic variation of adenylation domains of the anabaenopeptin synthesis operon and evolution of substrate promiscuity. *Journal of bacteriology*, 193(15), 3822-3831
- Dittmann, E., Neilan, B. A., Erhard, M., von Doehren, H., Boerner, T. (1997). Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Mol. Microbiol.* 26: 779-787
- Dittmann, E., B., Neilan, A., Börner, T. (2001). Molecular biology of peptide and polyketide biosynthesis in cyanobacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57(4): 467-73
- Donia MS, Schmidt EW (2011) Linking Chemistry and Genetics in the Growing Cyanobactin Natural Products Family. *Chemistry & Biology* 18:508-519
- Fastner, J., Erhard, M., Carmichael, W.W., Sun, F., Rinehart, K.L., Röncke, H., and Chorus, I. (1999) Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. *Arch Hydrobiol* 145:147-163
- Fewer DP, Rouhiainen L, Jokela J, Wahlsten M, Laakso K, Wang H, Sivonen K (2007) Recurrent adenylation domain replacement in the microcystin synthetase gene cluster. *BMC Evolutionary Biology* 7:183

Hoiczky E, Baumeister W (1998) The junctional pore complex, a prokaryotic secretion organelle, is the molecular motor underlying gliding motility in cyanobacteria. *Current Biology* 8:1161-1168

Hopwood, D. A (1997) Genetic Contributions to Understanding Polyketide Synthases, *Chem. Rev.* 97: 2465-2498

Ishida, K., Christiansen, G., Yoshida, W. Y., Kurmayer, R., Welker, M., Valls, N., ... & Dittmann, E. (2007). Biosynthesis and structure of aeruginoside 126A and 126B, cyanobacterial peptide glycosides bearing a 2-carboxy-6-hydroxyoctahydroindole moiety. *Chemistry & biology*, 14(5), 565-576

Ishida K, Welker M, Christiansen G, Cadel-Six S, Bouchier C, Dittmann E, Hertweck C, N. TdM (2009) Plasticity and evolution of aeruginosin biosynthesis in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2017-2026

Kleinkauf, H., von Döhren, H. (1996). A nonribosomal system of peptide biosynthesis, *Europ. J. Biochem.* 236: 335-351

Komarek, J. (1992). Diversity and modern classification of Cyanobacteria (Cyanoprokaryota). inaugural dissertation

Kramer, D (2009). Charakterisierung der Microginin Synthetase des Cyanobakteriums *Microcystis aeruginosa* HUB 5-3, Dissertation

Kurmayer, R., Christiansen, G., Gumpenberger, M., Fastner J. (2005). Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*, *Mircobiology* 151:1525-1533

Lee SW, Mitchell DA, Markley AL, Hensler ME, Gonzalez D, Wohlrab A, Dorrestein PC, Nizet V, Dixon JE (2008) Discovery of a Widely Distributed Toxin Biosynthetic Gene Cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:5879-5884

Leikoski N, Fewer DP, Jokela J, Wahlsten M, Rouhiainen L, Sivonen K (2010) Highly Diverse Cyanobactins in Strains of the Genus *Anabaena*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:701-709

Moore RE (1996) Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: a review. *Journal of Industrial Microbiology* 16:134-143

Murakami M., Suzuki S., Itou Y., Kodani S., Ishida K. 2000. New anabaenopeptins, potent carboxypeptidase-A inhibitors from the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *J. Nat. Prod.* 63:1280–1282

Mutschler, H., Gebhardt, M., Shoeman, R. L., & Meinhart, A. (2011). A novel mechanism of programmed cell death in bacteria by toxin–antitoxin systems corrupts peptidoglycan synthesis. *PLoS biology*, 9(3), e1001033

Paerl, H. W., Fulton, R. S., Moisander, P. H., & Dyble, J. (2001). Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *The Scientific World Journal*, 1, 76-113

Philmus, B., Christiansen, G., Yoshida, W. Y., & Hemscheidt, T. K. (2008). Post-translational Modification in Microviridin Biosynthesis. *ChemBioChem*, 9(18), 3066-3073

Philmus, B., Guerrette, J. P., & Hemscheidt, T. K. (2009). Substrate specificity and scope of MvdD, a GRASP-like ligase from the microviridin biosynthetic gene cluster. *ACS chemical biology*, 4(6), 429-434

Rantala, A., Fewer, D.P., Hisbergues, M., Rouhiainen, L., Vaitomaa, J., Börner, T., Sivonen, K. (2004). Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis, *PNAS* 101(2):568-573

- Raven, P.H. (2006, 4. Auflage) Biologie der Pflanzen. Gruyter Verlag, ISBN-10: 3110185318
- Reynolds, C., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L., Melo, S. (2002) Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton, Review. Journal of Plankton Research, Vol. 24, Number 5, 417-428
- Rippka, R. (1988). Isolation and purification of cyanobacteria, Meth. Enzymol.167: 3-27
- Rohrlack T, Dittmann E, Henning M, Börner T, Kohl J-G (1999) Role of microcystins in poisoning and food ingestion inhibition of *Daphnia galeata* caused by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Appl. Env. Microbiol. 65:737-739
- Rouhiainen L, Jokela J, Fewer DP, Urmann M, K. S (2010) Two alternative starter modules for the non-ribosomal biosynthesis of specific anabaenopeptin variants in *Anabaena* (Cyanobacteria). Chem Biol 17:265-273
- Rounge, T., Rohrlack, T., Kristensen, T., & Jakobsen, K. (2008). Recombination and selectional forces in cyanopeptolin NRPS operons from highly similar, but geographically remote *Planktothrix* strains. BMC microbiology, 8(1), 141
- Rounge, T., Rohrlack, T., Nederbragt, A., Kristensen, T., & Jakobsen, K. (2009). A genome-wide analysis of nonribosomal peptide synthetase gene clusters and their peptides in a *Planktothrix rubescens* strain. BMC genomics, 10(1), 396
- Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A., & Lukyanov, S. A. (1995). An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. Nucleic Acids Research, 23(6), 1087
- Sivonen K, Jones G (1999) Cyanobacterial toxins. I. Chorus & J. Bartram (eds.) Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. WHO, E & FN Spon, London:41-112
- Sivonen K, Börner T (2008) Bioactive compounds produced by cyanobacteria. In: Antonia Herrero and Enrique Flores: The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution. Caister Academic Press: Norfolk, UK:159-197
- Streble, H., Krauter, D. (2002, 9. Auflage) Das Leben im Wassertropfen. Kosmos Verlag, ISBN-10: 3440084310
- Suda, S., Watanabe, M.M., Otsuka, S., Mahakahant, A., Yongmanitchai, W., Nopartnaraporn, N. et al. (2002). Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatoriod cyanobacteria, Int. J. Syst. Evol. Micr. 52: 1577-1595
- Utkilen, H.C., Skulberg, O.M., Walsby, A.E. (1985). Buoyancy regulation and chromatic adaptation in planktonic *Oscillatoria* species: alternative strategies for optimising light absorption in stratified lakes, Arch Hydrobiol 104: 407-417
- Walsby, A., Schanz, F., Schmid, M. (2006) The Burgundy-blood phenomenon: a model of buoyancy change explains autumnal waterblooms by *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich; New Phytologist 169: 109–122
- Welker, M., & Von Döhren, H. (2006). Cyanobacterial peptides–nature's own combinatorial biosynthesis. FEMS microbiology reviews, 30(4), 530-563

Anhang A *ociB* Sequenzen

>916

TGGTTTTTTAGATCAATTTGAGTCCGATAGTTCTTTTTTACAATATTCCCCTAGCTTTGCATTTAGAGGGAAACCTT
AATCAAGACGTTTTTGATCCAGAGTTTAGAGGAAATTTGCGATCGCCATGAAGCCTTAAGGACTAACTTCATTAGC
GTTGATGGTGTGCTACTCAGGTTATACAAACGCAAACCCCTGGACAGTGAACATCGTTGATTTACAACACTTA
TCTAGTAGTGAACAGGAAATTGCCTCTCAGGAGTTAACCCAAAACAGGCCATTCAACCCCTTGACTTAGCCCGT
GACCCGTTAATCAGAGCAAACCTTAGTCATCTTATCTGAGACAGAACATATTTTATTAGTCTGTATGCACCATATT
GTCAGTGACGGCTGGTCAATGGGGGTCTTTCTTCAGGAATTAACCGACCTCTATAACGCATACATTCAAAATCAG
CCCTCATCTTTAAAGCCGTTACCGATTACGTACGGTGATTACACTCTTTGGCAAAAACAGTGG

>712

TGGTTTTTTAGATCAATTTGAGTCCGATAGTTCTTTTTTACAATATTCCCCTAGCTTTGCATTTAGAGGGAAACCTT
AATCAAGACGTTTTTGATCCAGAGTTTAGAGGAAATTTGCGATCGCCATGAAGCCTTAAGGACTAACTTCATTAGC
GTTGATGGTGTGCTACTCAGGTTATACAAACGCAAACCCCTGGACAGTGAACATCGTTGATTTACAACACTTA
TCTAGTAGTGAACAGGAAATTGCCTCTCAGGAGTTAACCCAAAACAGGCCATTCAACCCCTTGACTTAGCCCGT
GACCCGTTAATCAGAGCAAACCTTAGTCATCTTATCTGAGACAGAACATATTTTATTAGTCTGTATGCACCATATT
GTCAGTGACGGCTGGTCAATGGGGGTCTTTCTTCAGGAATTAACCGACCTCTATAACGCATACATTCAAAATCAG
CCCTCATCTTTAAAGCCGTTACCGATTACGTACGGTGATTACACTCTTTGGCAAAAACAGTGG

>704

TGGTTTTTTAGATCAATTTGAGTCCGATAGTTCTTTTTTACAATATTCCCCTAGCTTTGCATTTAGAGGGAAACCTT
AATCAAGACGTTTTTGATCCAGAGTTTAGAGGAAATTTGCGATCGCCATGAAGCCTTAAGGACTAACTTCATTAGC
GTTGATGGTGTGCTACTCAGGTTATACAAACGCAAACCCCTGGACAGTGAACATCGTTGATTTACAACACTTA
TCTAGTAGTGAACAGGAAATTGCCTCTCAGGAGTTAACCCAAAACAGGCCATTCAACCCCTTGACTTAGCCCGT
GACCCGTTAATCAGAGCAAACCTTAGTCATCTTATCTGAGACAGAACATATTTTATTAGTCTGTATGCACCATATT
GTCAGTGACGGCTGGTCAATGGGGGTCTTTCTTCAGGAATTAACCGACCTCTATAACGCATACATTCAAAATCAG
CCCTCATCTTTAAAGCCGTTACCGATTACGTACGGTGATTACACTCTTTGGCAAAAACAGTGG

>981

TGGTTTTTTAGATCAATTTGAGTCCGATAGTTCTTTTTTACAATATTCCCCTCGCTTTGCGTTTAGAGGGAAACCTT
AATCAAGAAGTTTTTGATCCAGAGTTTAGAGGAAATTTGCGATCGCCATGAAGCCTTGAGGACTAATTTATTACC
GTTGATGGTGTGCTACTCAGGTTATACAAACGCAAGCCCCCTGGACAGTGACCATCGTTGATTTACAACCTTTA
TCTAGTCGTGAACAGGAAATTGCCTCTCAGGAATTAACCCAAAACAGGCCATTCAACCCCTTGACTTAGCCCGT
GACCCGTTAATCAGAGCAAACCTTAGTCATCTTATCTGAGACAGAACATATTTTATTAGTCTGTATGCACCATATT
GTCAGTGACGGCTGGTCAATGGGGGTCTTTCTTCAGGAATTAACCGACCTCTATAACGCATACATTCAAAATCAG
CCCTCATCTTTAAAGCCGTTACCGATTACGTACGGTGATTACACTCTTTGGCAAAAACAGTGG

>708

TGGTTTTTTAGATCAATTTGAGTCCGATAGTTCTTTTTTACAATATTCCCCTAGCTTTGCATTTAGAGGGAAACCTT
AATCAAGACGTTTTTGATCCAGAGTTTAGAGGAAATTTGCGATCGCCATGAAGCCTTAAGGACTAACTTCATTAGC
GTTGATGGTGTGCTACTCAGGTTATACAAACGCAAACCCCTGGACAGTGAACATCGTTGATTTACAACACTTA
TCTAGTAGTGAACAGGAAATTGCCTCTCAGGAGTTAACCCAAAACAGGCCATTCAACCCCTTGACTTAGCCCGT
GACCCGTTAATCAGAGCAAACCTTAGTCATCTTATCTGAGACAGAACATATTTTATTAGTCTGTATGCACCATATT
GTCAGTGACGGCTGGTCAATGGGGGTCTTTCTTCAGGAATTAACCGACCTCTATAACGCATACATTCAAAATCAG
CCCTCATCTTTAAAGCCGTTACCGATTACGTACGGTGATTACACTCTTTGGCAAAAACAGTGG

Anhang B *mcyT* Sequenzen

>Furnas2

ATTGTGAGGTTGATCAGGGGTTATGAGTGATGGAAGACACAGGAATTGGGTGATTTGTCCCATTTTAATGGGCGC
GGTAGGATTAGTTGGTTATCTTTCCTATCGTAGTGGACAAAAAGCGGTAGAAGATATGGCAAAACCTTTGATGGT
AGAAATCGGCGATCCCGATGTCCAAGTTGTAATAGAATTAATTAAGAAATTCAGATCCAGAAATTCCTCTAAT
CCAATTTCTAACAAAAGCAGTGCAGGAAATTTCAATTTGAACAGATAGTTGACTTAATTGATCCCCTGATCAATGA
TCAATAGCGATTTTCCCAAGCATTCTAGGACAAGAGATTTGGCTGAGTGCAAAAAGAAATGATCTCCGGGAAACA
TCTCCACAGAGAAAGCCGAGTTGGTTTGTTCACCAAGCTTCTATCTCCAAGGCGTTAGGTTTCAAATCTTCTA
A

>Daniell

ATTGTGAGGTTGATCAGGGGTTATGAGTGATGGAAGACACAGGAATTGGGTGATTTGTCCCATTTTAATGGGCGC
GGTAGGATTAGTTGGTTATCTTTCCTATCGTAGTGGACAAAAAGCGGTAGAAGATATGGCAAAACCTTTGATGGT
AGAAATCGGCGATCCCGATGTCCAAGTTGTAATAGAATTAATTAAGAAATTCAGATCCAGAAATTCCTCTAAT
CCAATTTCTAACAAAAGCAGTGCAGGAAATTTCAATTTGAACAGATAGTTGACTTAATTGATCCCCTGATCAATGA
TCAATAGCGATTTTCCCAAGCATTCTAGGACAAGAGATTTGGCTGAGTGCAAAAAGAAATGATCTCCGGGAAACA
TCTCCACAGAGAAAGCCGAGTTGGTTTGTTCACCAAGCTTCTATCTCCAAGGCGTTAGGTTTCAAATCTTCTA
ATCCACC

>704

ATTGTGAGGTTGATCAGGGGTTATGAGTGATGGAAGACACAGGAATTGGGTGATTTGTCCCATTTTAATGGGCGC
GGTAGGATTAGTTGGTTATCTTTCCTATCGTAGTGGACAAAAAGCGGTAGAAGATATGGCAAAACCTTTGATGGT
AGAAATCGGCGATCCCGATGTCCAAGTTGTAATAGAATTAATTAAGAAATTCAGATCCAGAAATTCCTCTAAT
CCAATTTCTAACAAAAGCAGTGCAGGAAATTTCAATTTGAACAGATAGTTGACTTAATTGATCCCCTGATCAATGA
TCAATAGCGATTTTCCCAAGCATTCTAGGACAAGAGATTTGGCTGAGTGCAAAAAGAAATGATCTCCGGGAAACA
TCTCCACAGAGAAAGCCGAGTTGGTTTGTTCACCAAGCTTCTATCTCCAAGGCGTTAGGTTTCAAATCTTCTA
ATCCACC

>707

ATTGTGAGGTTGATCAGGGGTTATGAGTGATGGAAGACACAGGAATTGGGTGATTTGTCCCATTTTAATGGGCGC
GGTAGGATTAGTTGGTTATCTTTCCTATCGTAGTGGACAAAAAGCGGTAGAAGATATGGCAAAACCTTTGATGGT
AGAAATCGGCGATCCCGATGTCCAAGTTGTAATAGAATTAATTAAGAAATTCAGATCCAGAAATTCCTCTAAT
CCAATTTCTAACAAAAGCAGTGCAGGAAATTTCAATTTGAACAGATAATTGACTTAATTGATCCCCTGATCAATGA
TCAATAGCGATTTTCCCAAGCATTCTAGGACAAGAGATTTGGCTGAGTGCAAAAAGAAATGATCTCCGGGAAACA
TCTCCACAGAGAAAGCCGAGTTGGTTTGTTCACCAAGCTTCTATCTCCAAGGCGTTAGGTTTCAAATCTTCTA
ATCCACC

>708

ATTGTGAGGTTGATCAGGGGTTATGAGTGATGGAAGACACAGGAATTGGGTGATTTGTCCCATTTTAATGGGCGC
GGTAGGATTAGTTGGTTATCTTTCCTATCGTAGTGGACAAAAAGCGGTAGAAGATATGGCAAAACCTTTGATGGT
AGAAATCGGCGATCCCGATGTCCAAGTTGTAATAGAATTAATTAAGAAATTCAGATCCAGAAATTCCTCTAAT
CCAATTTCTAACAAAAGCAGTGCAGGAAATTTCAATTTGAACAGATAGTTGACTTAATTGATCCCCTGATCAATGA
TCAATAGCGATTTTCCCAAGCATTCTAGGACAAGAGATTTGGCTGAGTGCAAAAAGAAATGATCTCCGGGAAACA
TCTCCACAGAGAAAGCCGAGTTGGTTTGTTCACCAAGCTTCTATCTCCAAGGCGTTAGGTTTCAAATCTTCTA
ATCCACC

>710

ATTGTGAGGTTGATCAGGGGTTATGAGTGATGGAAGACACAGGAATTGGGTGATTTGTCCCATTTTAATGGGCGC
GGTAGGATTAGTTGGTTATCTTTCCTATCGTAGTGGACAAAAAGCGGTAGAAGATATGGCAAAACCTTTGATGGT
AGAAATCGGCGATCCCGATGTCCAAGTTGTAATAGAATTAATTAAGAAATTCAGATCCAGAAATTCCTCTAAT
CCAATTTCTAACAAAAGCAGTGCAGGAAATTTCAATTTGAACAGATAGTTGACTTAATTGATCCCCTGATCAATGA
TCAATAGCGATTTTCCCAAGCATTCTAGGACAAGAGATTTGGCTGAGTGCAAAAAGAAATGATCTCCGGGAAACA
TCTCCACAGAGAAAGCCGAGTTGGTTTGTTCACCAAGCTTCTATCTCCAAGGCGTTAGGTTTCAAATCTTCTA
ATCCACC

>711

GAGGTTGATCAGGGGTTATGAGTGATGGAAGACACAGGAATTGGGTGATTTGTCCCATTTTAATGGGCGCGGTAG
GATTAGTTGGTTATCTTTTCTATCGTAGTGACAAAAAGCGGTAGAAGATATGGCAAAACCTTTGATGGTAGAAA
TCGGCGATCCCGATGTCCAAGTTGTAATAGAATTAATTAAAGAAATTCCAGATCCAGAAATTCCTCTAATCCAAT
TTCTAACAAAAGCAGTGCGGAAATTTCAATTTGAACAGATAGTTGACTTAATTGATCCCCTGATCAATGATCAAT
AGCGATTTTCCCAAGCATTCTAGGACAAGAGATTTGGCTGAGTGCAAAAAGAAATGATCTCCGGGAAACATCTCC
ACAGAGAAAGCCGAGTTGGTTTGTTCACCAAGCTTCTATCTCCAAGGCGTTAGGTTTCAAATCTTCTAATCCA
CC

>712

ATTGTGAGGTTGATCAGGGGTTATGAGTGATGGAAGACACAGGAATTGGGTGATTTGTCCCATTTTAATGGGCGC
GGTAGGATTAGTTGGTTATCTTTTCTATCGTAGTGACAAAAAGCGGTAGAAGATATGGCAAAACCTTTGATGGT
AGAAATCGGCGATCCCGATGTCCAAGTTGTAATAGAATTAATTAAAGAAATTCCAGATCCAGAAATTCCTCTAAT
CCAATTTCTAACAAAAGCAGTGCGGAAATTTCAATTTGAACAGATAGTTGACTTAATTGATCCCCTGATCAATGA
TCAATAGCGATTTTCCCAAGCATTCTAGGACAAGAGATTTGGCTGAGTGCAAAAAGAAATGATCTCCGGGAAACA
TCTCCACAGAGAAAGCCGAGTTGGTTTGTTCACCAAGCTTCTATCTCCAAGGCGTTAGGTTTCAAATCTTCTA
ATCCACC

>713

ATTGTGAGGTTGATCAGGGGTTATGGGTGATGGAAGACACAGGAATTGGGTGATTTGTCCCATTTTAATGTGAAT
ATTTGTATTAGGGTGGGGAATGCGATCGCTCAATTCTACGGAGATTTATAGATAATGCAAACTGAACTAAAGTC
TCTTTACGATCACAAGAAAAAACTAAAATATTCATGGTTAATCCTCGTCCCAAACTGCCAAAAAAACCAGACAA
ATTCCCCTGAGATTACTATTGATTGTCCCCTTTGTATTGCAAATTTGTAGGCGCGGTAGGATTAGTCGGTTATCTT
TCCTATCGTAGTGACAAAAAGCGGTAGAAGATATGGCAAAACCTTTGATGGTAGAAATCGGCGATCCCGATGTC
CAAGTTGTAATAGAATTAATTAAAGAAATTCCAGATCCAGAAATTCCTCTAATCCAATTTCTAACAAAAGCAGTG
CGGAAATTTCAATTTGAACAGATAATTGACTTAATTGATCCCCTGATCAATGATCAATAGCGATTTTCCCAAGCA
TTCTAGGACAAGAGATTTGGCTGAGTGCAAAAAGAAATGATCTCCGGGAAACATCTCCACAGAGAAAGCCGAGTT
GGTTTGTTCGCCAAGCTTCTATCTCCAAGGCGTTAGGTTTCAAATCTTCTAATCCACC

>934

ATTGTGAGGTTGATCAGGGGTTATGAGTGATGGAAGACACAGGAATTGGGTGATTTGTCCCATTTTAATGGGCGC
GGTAGGATTAGTTGGTTATCTTTTCTATCGTAGTGACAAAAAGCGGTAGAAGATATGGCAAAACCTTTGATGGT
AGAAATCGGCGATCCCGATGTCCAAGTTGTAATAGAATTAATTAAAGAAATTCCAGATCCAGAAATTCCTCTAAT
CCAATTTCTAACAAAAGCAGTGCGGAAATTTCAATTTGAACAGATAGTTGACTTAATTGATCCCCTGATCAATGA
TCAATAGCGATTTTCCCAAGCATTCTAGGACAAGAGATTTGGCTGAGTGCAAAAAGAAATGATCTCCGGGAAACA
TCTCCACAGAGAAAGCCGAGTTGGTTTGTTCACCAAGCTTCTATCTCCAAGGCGTTAGGTTTCAAATCTTTAA

>976

ATTGTGAGGTTGATCAGGGGTTATGAGTGATGGAAGACACAGGAATTGGGTGATTTGTCCCATTTTAATGGGCGC
GGTAGGATTAGTTGGTTATCTTTTCTATCGTAGTGACAAAAAGCGGTAGAAGATATGGCAAAACCTTTGATGGT
AGAAATCGGCGATCCCGATGTCCAAGTTGTAATAGAATTAATTAAAGAAATTCCAGATCCAGAAATTCCTCTAAT
CCAATTTCTAACAAAAGCAGTGCGGAAATTTCAATTTGAACAGATAGTTGACTTAATTGATCCCCTGATCAATGA
TCAATAGCGATTTTCCCAAGCATTCTAGGACAAGAGATTTGGCTGAGTGCAAAAAGAAATGATCTCCGGGAAACA
TCTCCACAGAGAAAGCCGAGTTGGTTTGTTCACCAAGCTTCTATCTCCAAGGCGTTAGGTTTCAAATCTTCTA
A

>981

ATTGTGAGGTTGATCAGGGGTTATGAGTGATGGAAGACACAGGAATTGGGTGATTTGTCCCATTTTAATGGGCGC
GGTAGGATTAGTTGGTTATCTTTTCTATCGTAGTGACAAAAAGCGGTAGAAGATATGGCAAAACCTTTGATGGT
AGAAATCGGCGATCCCGATGTCCAAGTTGTAATAGAATTAATTAAAGAAATTCCAGATCCAGAAATTCCTCTAAT
CCAATTTCTAACAAAAGCAGTGCGGAAATTTCAATTTGAACAGATAGTTGACTTAATTGATCCCCTGATCAATGA
TCAATAGCGATTTTCCCAAGCATTCTAGGACAAGAGATTTGGCTGAGTGCAAAAAGAAATGATCTCCGGGAAACA
TCTCCACAGAGAAAGCCGAGTTGGTTTGTTCACCAAGCTTCTATCTCCAAGGCGTTAGGTTTCAAATCTTCTA
ATCCACC

>9214

ATTGTGAGGTTGATCAGGGGTTATGAGTGATGGAAGACACAGGAATTGGGTGATTTGTCCCATTTTAATGGGCGC
GGTAGGATTAGTTGGTTATCTTTCCTATCGTAGTGGAACAAAAAGCGGTAGAAGATATGGCAAAACCTTTGATGGT
AGAAATCGGCGATCCCGATGTCCAAGTTGTAATAGAATTAATTAAAGAAATTCCAGATCCAGAAATTCCTCTAAT
CCAATTTCTAACAAAAGCAGTGCGGAAATTTCAATTTGAACAGATAGTTGACTTAATTGATCCCCTGATCAATGA
TCAATAGCGATTTTCCCAAGCATTCTAGGACAAGAGATTTGGCTGAGTGCAAAAAGAAATGATCTCCGGGAAACA
TCTCCACAGAGAAAGCCGAGTTGGTTTGTTCACCAAGCTTCTATCTCCAAGGCGTTAGGTTTCAAATCTTCTA
ATCCACC

Anhang C Genome Walking Sequenzen

>gw257apnE

GCTCGAGTTTTTTTCAGCAAGATACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGGCATCCTGTCCATGTTGACCACAG
AGTTATATGTCTTTTTTATTTTAACTCATTAGATTGGCGATCGCACATTTCTATCTTCCCCAAAATGCGATCGCA
CTCTTATTTTTCCCAAAATCGCACCTTGCCTTTTTTTCACGCTTTTGGGCATCGCACCTTGCTATCCAGCGAGCAGA
GCTATAATAACAAAAACCATCTGAAGTGCATCGCGCTTCACTTAATTTATCCGAATGTGAATCGTCAAGTGAGC
GATCAAGAACTCAGTGAAGTTCTACAACAAGTGAATCTTCAAGATGTGCTTACCAGGGTGGGAGGCTTTGATCAA
GAAGTCCCTTGGGAAAATATATTATCACTAGGGGAACAACAACGTTTGGCTTTTGGCCGAATATTAGTGACCCGT
CCTCATTTTTGTTATCTTAGATGAATCAACTAGTGCTTTGGATTTGATCAATGAAAAGAATTTATATCAACAGTTA
AAAGAAACAAAAACAACCTTTTATTAGTGTGGGACATCGGGAAAGTATTTTTGATTACCACCAATGGGTTTTGGAA
CTCTCACCCGATTCTGGTTGGTAAGTGTAAACGTACAGGATTATCATCGGCAAAAAGCTAAAGAAATTATCAAT
ATTCCCCTTGACAATGCTCACATCACCATAGACAATCTGTCTAGTAATGAATCCCCGACTCAACCCATACCTGAA
ATAGCGGTATTAAGTACAAATTTGAGGGATTTTCCCATAAAGAAATGGAGGTCTTGACCAACTACTCAATAGGC
ACTATCAAAG

>gw257.2apnE

ATGGCTCGAGTTTTTTCAGCAGATCGATCGCCAATCTAATGAGTTAAAAATAAAAAAGACATATAACTCTGTGGTCA
ACATGGACAGGATATCGGTCAACCCTCAAATCCACTTCGGTAAGCCTTGCCATAGTGGGTACGCGCATTACTGTTT
AGAGTGTCTCGAATTACTAAATGAAGGACTTTCTTTGTAGAAATTATCCGAGACTACTATCCCGATTTGCAAG
TAGAGGATATTAGAGCTGTCTACAGTATGCGATCGCACTGGTGGCGCTGAGGATGTTTCATTTGACCTTAGCTT
AAATTATGAAATTTCTGATAGACCAAGATGTATACGCAACCGCCACAAAATTTTTGATTGATGCAGGACATGATG
TAATTGTTGTGCTCGAGCCCTATAGTGAGATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAA
ATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTTCAGGCTGTATATTA AAACTTATATTAAGAACTATGCTAACCA
CCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGGCAATCGACTCTCATGAAAACCTACGAGCTAAATATT
CAATATGTTTCTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTTTTTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAG
ACAGGAATTTTATTA AAAATTTAAATTTTGAAGAAAGTTTCAGGGTTAATAGCATCCATTTTTTGCTTTGCAAGTT
CCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCTCTTTTGACATGTTTAAAGTTTAAACCTCCTGTGTGAAATTTGTTATCCG
CTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTC
ACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCAATTGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGCCAGCTGCATTAATGAAT

>gw257.3apnE

TTAGCAGATTGACCTTAGCTTAAATTATGAAATTTCTGATAGACCAAGATGTATACGCAACCGCCACAAAATTTT
TGATTGATGCAGGACATGATGTAATTGTTGTGCTCAAATGGGTCTAGCGCAAGCAAGTGATGAAGAAATACTCA
GAGTAGCCCAAGCAGAAAATCGCATCCTTATTACGCGAGACAGAGATTACGGAAATCTTGTTTTTGAGGGCGA
TCGCAACAGGTGTGATTTACCTTCGAGTTTTACCTAAAACGGTGAATGCAGTTTATAACGAACTAGCAGGAGTCA
TAGAAAATTACTCTGAAGTAGAACTAAAAGGGGCATTTGTGGTTGTAGAACCTGATGGACATCGGTTTAGAAAAC
CGCTTACATAGAGAGTTAATTAATCTGGTGTGGAAGGAAAGGGCGATCGCATTTTCTAGCTCCTAAATTGCT
ATAATAACAATCAACCCAAAAATCTCAACATCAAGCATAATGTCTACTTATAGCGAGGTACTGAGTCAGGCTCAA
AATCTCACTCCTGACGAGCAACAACAACCTTTAGAAGTATTGTGTCAGCATTGATGCGCGATCGGGTAACAACCCAG
ACTCAGGGTGGCAGTGAAAGATTGCCAGGAAAAGTTTACCGCCGGCGCGCTCGAGCCCTATAGTGAGATC
TTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTT
CAGGCTGTATATTA AAACTTATATTAAGAACTATGCTAACCACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTT
TTCTTGGCAATCGACTCTCATGAAAACCTACGAGCTAAATATTCAATATGTTTCTCTTGACCAACTTTATTCTGCA
TTTTTTTTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGAACTGAGACAGGAATTTTATTA AAAATTTAAATTTTGAAGA
AAGTTTCAGGTTAATAGCATCCATTTTTTGCTTTGCAGTTCTCT

>gw257cptiG1.1

GCTCGAGTTTTTTTCAGCAGATACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCATTCGCAGTTGCCAGGTTTACTGCATACA
TCCAGTCTGCGACCTGAGAAAGTACAAAATCTCGATATTTTAAATCGTTGAGAATTGGTCAGTGGCATCTATTTT
GGCCCAGCAGGTGCGGGTACGGATGAAAAGGGAGCCTACGGCTATCACACCATGTGGTATTACGATCAGGAAATT
CGTCGTATTGCAAAGGTAGCCCTCCAAAAAGCCCAGGAACGTCGAGGTTTACTTACCGTTGCCACAAAAGAAAAT
GCCCTACCTCAGATTCTTGGACTCGATTGGTACAAGAGGAAGCTACCAATTTTCTGATGTGGTGGTGTCCCCA
ATGCTCGTTGATAACTTAGCCATGCAACTGGTTCTCAATCCTCAACAATTTGATGTGATTTTGGCAGGGAATATG
TTTATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAA
GATTTTTCAGGCTGTATATTA AAACTTATATTAAGAACTATGCTAACCACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCG
TGGGTTTTCTTGGCAATCGACTCTCATGAAAACCTACGAGCTAAATATTCAATATGTTTCTCTTGACCAACTTTAT
TCTGCATTTTTTTTTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTATTA AAAATTTAAATTT
TTGAAGAAAGTTTCAGGGTTAATAGCATCTTTTTTGTCTTTGCAAGTTTCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCT
CTTTTGACATGTTTAAAGTTTAAACCTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCC
GGAAGCATAA

>gw976apnE

TGGCTCGAGTTTTTTCAGCAGATACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCATCTTTTTTGACATTTTGCCA
CAAAGATTCCGAGGTGAAATTTTCTTTGTTTAAAGTAACGATTTATGGTATCATGGCTAACATTTTCTAAGTGTTT
GGCTAAGTTATTTAAGGTATAATTGTTTGGGCTGCTCAATAGATATTGGCAGTAATCTAGTTGGCTAAACGACAT
ATTTTTTCACCCCAAATTAACCTTAATCAGTTTAGCATAAATATTGACTGTTAAATATCTGTCAATCAGCATAATTT
TTGTGTCTAAATTTTATATTGCTGGCGCAAATACTTGAACAATTGGCAGCGTTTCGCTGGCTTACTGCACACTATA
TATAGTGTGCCTGCGTAAGTCCTGTAACCTGTTAACCCTACAGGATTATCATCGGCAAAAAGCTAAAGAAATTATC
AATATTTCCCTTGACAATGCTCAAATCACCATAGACAATCTGTCTAGTAATGAATCCCCGACTCAGCCCATACCT
GAAATAGCGGTATTAACCTGACAAATTTGAGGGATTTTCCATAAAAGAAATGGAGGTCTTGACCACTACTCAATA
GGCACTATCAGAAGTAAAGCCAGCCTTGGTAAGTCTATTACTGGCAATGATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATA
TTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATATTAAAACTTATA
TTAAGAAGTATGCTAACACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGGAATCGACTCTCATGA
AACTACGAGCTAAATATTCAATATGTTCTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTTTTTTGAACGAGGTTTAGA
GCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTATTAAAAATTTAATTTTGAGAAAGTTCAGGGTTAATAGCATCCA
TTTTTTGCTTTG

>gw976.2apnE

TTAGCAGATTTTACCTCGGAATCTTTGTGGCAAAATGTCAAAAAAGATATCCAAATCAGTGAAAAATAGTGCGATC
ATTTTTTGATGATACAGTATTGGATAAAAGGTTTCGGGAAAAAAATTTGAATTAGTCCGTCGTCATATAGCGGAACA
GAACATCGTGTACTGTGAGGTATTGGGCTGGTTAACTGTGTTTATGTTAATCCAGAACTGGGTTTATTTTGGGTA
ATTGATTATCGCATATATGATCCAGAATATGATAATAGAACCAAAAACAGAACAGAAATATGTAGCAACTAATGACT
TAACTCAAGCATCCACATTGGATACGAAAAAACCTGTGCTATTCGCTGGAAAAATAGAGGAGTTTCACCGAGAAA
TTAAGCAGTTAACTGGGATTGAATCTTGCCAGTGTGCTAAAGCTAGTATTCAAAGAAATCATATTGCTTGTGCCC
TTTTAGTTTGGGAATCAATTGAAAAGATTAGCTCATCTGACAAAGAAAACAGTCTATCAGTTAAAAAGCTGAATCTT
TGTCCAGTTATTTAATCAAAGAACTGAATTGTCTCTCGATAAAAAATGGAACCTGTTTGATTCTTTTGGGTTTATT
TTTACCTGCCCCGGGCAGGTGGCTCGAGCCCTATAGTGAGATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTG
CCATGGAATAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATATTAAAACTTATATTAAAGAACTA
TGCTAACCACTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGGAATCGACTCTCATGAAAACTACGAG
CTAAATATTCAATATGTTCTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTTTTTTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAG
AACTGAGACAGGAATTTTATTAAAAATTTAAATTTTGAAGAAGTTCAGG

>gw976cptiG

TGGCTCGAGTTTTTTCAGCAGATACTCACTATAGGGCTCGAGAATTGGTCAGTGGCATCTATTTTGGCCCAGCAGG
TCGGGGTACGGATGAAAAGGGAGCCTACGGCTATCACACCATGTGGTATTACGATCAGGAAATTCGTCGTATTGC
AAAGGTAGCCCTCCAAAAGCCCAGGAACGTCGAGGTTTACTTACCGTTGCCACAAAGAAAATGCCCTACCTCA
GATTCCTTGGACTCGATTGGTACAAGAGGAAGCTACCAATTTTCTGATGTGGTGGTGTCCCCAATGCTCGTTGA
TAACTTAGCCATGCAACTGGTTCTCAATCCTCAACAATTTGATGTGATTTTGGCAGGGAATATGTTTATCTTTCT
AGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGC
TGTATATTAAAACTTATATTAAAGAACTATGCTAACACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTT
GGCAATCGACTCTCATGAAAACCTACGAGCTAAATATTCAATATGTTCTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTT
TTTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTATTAAAAATTTAAATTTTGAAGAAAGT
TCAGGGTTAATAGCATCCATTTTTTTGCTTTGCAAGTTTCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCTCTTTTGACATG
TTTAAAGTTTAAACCTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACATTATACGAGCCGGAAGCATAAA
GTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCAATTGCTTTCCA
GTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGG

>976.2cptiG

TTCGGATGGCTCGAGTTTTTTCAGCAAGATACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGTAACGATATTT
TACCGCCGAGGAGGTGGTGGAGTTATGGAAAAATGGCATCTTTGAATAAATCATCCTATCGTATCGTTGCCATCC
CAGGAGAAGGTATTGGGCCTGAAGTCGTGAAGCGTCCTTAACCATTCTGCGCCGAGTTGCCCAACTTGAGGGAT
TTGCCTTAACTATAGACTATGGCTTGCTCGGTGGCATGGCCTTAGAAAAATTAGGTAGTACTTTTCCCCCAGAAA
CTAGCCAACAGTGTGAAGGTCTGATGGCATTGTTTTTGGGGCAGTGAGTCAAGGGGGACTTCTAGAAGTACGGA
GGCACTTCGACTTTTTTATTAATCTGCGACCCATTTCGAGTTGCCAGGTTTACTGCATACATCCAGTCTGCGAC
CTGAGAAAGTACAAAATCTCGATATTTTAAATCGTTTCGAGAATTGGTCAGTGGCATCTATTTTGGCCCAGCAGGTC
GGGGTACGGATGAAAAGGGAGCCTACGGCTATCACACCATGTATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAG
CTGCCATGGAATAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATATTAAAACTTATATTAGAA
CTATGCTAACCACTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGGAATCGACTCTCATGAAAACCTAC
GAGCTAAATATTCAATATGTTCTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTTTTTTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTT
CAGGAACTGAGACAGGAATTTTATTAAAAATTTAAATTTTGAAGAAAGTTCAGGGTTAATAGCATCCATTTTTT
GCTTTGCAAGTTCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCTCTTTTGACATGTTTAAAGTTTAAACCTCCTGTGTGA
AATTGTTATCCGCTCACATTT

Anhang D IS-Element der IGS Region von *apn/oci*

>66_Fwd

GCTCGAGTTTTTTCAGCAAGATCCCAACAATTTGATGTGATTTTGGCAGGGAATATGTTTGGGGACATTCTCAGTG
ATATTGGTGGAGCGTTGGTAGGTTCAATTGGATTATTGGGATCGGCCAGTCTCAATAACCAGGGTTTGGGGATGT
ATGAAGCCATTCATGGAAC TGCCCCAGATATTGCTGGCAAGGGTATTGCCAACCCCTGGGTACTCTAGCGGGTT
GTGTTTTGATGCTACAACAATGGGGAGAAATCAAGGCAGCCCCAACGGATTCTCAAGGCCAGGAGCGACTGTTAG
GCAAAGGATACCGCACCGCCGATTTGTTCCCTCAAAACCACGAACTTTGGTCAATACGGCTACCTCGTTGACC
TATTCCTTGAAGAAATTTCCCTTGAACAACCTACTGAATAATGAGTTTAATCCATGACTGATGCTAACAAAATCC
TCTACCTGGGAAATGATATTAATACTGACGATATTATTCCCGCTAAAAGAGGGACTAATGATGATCCAGACCACT
TAAAACAATATGCTTTAGAACACATCATTGGCGTGGGAGAACTACTACAATATGATGAGATCGAAGCAGGGAATA
ATTTTGGCTGTGGATCAAGTCGAGAAATTGCCCCATTGCCCTAAAAGCGGCTGGCATCAAAAAAGTTAAAGCGC
GATCGTTTCGCCGAAATTTTCTATCGCAATAGTATTAATATTGGACTCCCTTAGAAAATTATTGGGGAGACGGAAC
AAAACCTGTGGTAGAAGCGATCGCCACTGCTGGGGGATTAATGGCCTTTAATCAAAAAGCGTCGTCAAGGCAAGG
TTAAATTCGCGCTAGTGTACCCCTGCCCGTCCCATGACCAGGGTGGAAAAGATGTTAGCAAAAAGCTTCGGGCA
ATGATTATGTGAAACCAGGGGAAAGGGGTGTTTGCCAAGATTGATCTGGCTTTATCCCATGACGCGGTGGCTAGT

>66.2_Fwd

TGCCGTCCATGACCAGGGTGGAAGATGTTAGCAAAAAGCTTCGGGCAATGATTATGTGAAACCAGGGGAAGGGGT
GTTTGCCAAGATTGATCTGGCTTTATCCCATGACGCGGTGGCTAGTTCGGTCGCGAAGGTATTTTATGACAATTA
TGGAAAAACCGCCCAATTATGGGATCCGCAACGGGTGGTATTAGTCGCTGATCACTTTATCCAAATTAATGACAT
TCGCCTTGATAACAAAGCCCCGGTTATGTATGAGCAGATGGTCAAATTTGCCCAAGCTCAAGGCTGTCATCTATT
TGATCTGGTTTTCCCCAGGGGAAGCGGCTGGTATCTGTTCATGTTTTGTTGCCAGAAAAAGGATTTATTTCGCCCTGG
AATGATCATTGCAGGAACGGACTCCCATACCTGTACCTATGGAGCTTTAGGAGCCTTTTCCACAGGGGTAGGAAC
CACAGACATGGCCAATATTTTTGCAATGGGGGATATGTGGATACGAGTCCCGCCAACCCTGGTGTTTGAGTTATC
GGGAACCCTTCCTCCTCAGATTAGTGCCAAGGATATTATCTTGTTTATTCTAGGCAAATTGGGCTGTGGGGGAGC
CACCAGTAAAGTTATGGAATTTCTGGCTCTATCATTGAACAATTGCCCTTAGATGAACGCTGACCTTGCTAA
TATGGCTATTGAATGTGGTGCTATGTGTGGTTTAATTGCGCGGATGAGGTGACAAACCATTATGTTACCAGTCG
CACACCAATTGGGTTTTGAAGACGCGTGCGCGAAGCGTGCCCTTGGCATCGCTGACCCCGATGCCGAGTATGAGGC
TGTTTATCAATTCGATCTGAGCCATTTGGAACCCAGGTTGCCCGTCCCCCTAAACCAGATCAGGTAGTTAACAT
TAGTCAATTAGAAGATGTTCCCATCACCAAAGCTTTTATTGGCTCTTGTACTGGCGGAAAACCTCTACGATCTCGC
TCAAGCGGCGGCTGTATTAAGATCGTCGGGTTGCCAGGGGGTAGATTTATTTCGTAG

>66.3_Fwd

TGTCTGGCGGAACCTCTACGATCTCGCTCAAGCGGCGGCTGTATTAAGATCGTCGGGTGCCCAGGGGGTAGAT
TTATTTCGTAGTGCCAGCTTCAATGGAGGTACGTCAAAAAGCCGAAGAATTGGGCTATCTTGCTATTTTTGAAGAA
TCTGGGGCGCAACTGCTCAAATCTGGTTGTGGAGCTTGTATTAATTCAGGAAAGGGAGTATTAGACAAGGAAGAA
ACGGGAGTCTATGCCACCAATCGTAATTTTAAAGGACGTAGTGGCGACCCTACCGCTAAAAATTTTGGCTTCC
CTAGAACCTGTCGCAATTTTCAGCTATTAAAGGAAAAATTACTGCCAATCTTGATTAATACTTTTCTGTTGACATC
CTCTCCGCCGTAGAACTTGAAGTGGTCTTTAATTCGAGGGTTGTATGATCGGGGCTTAACGAGAGAAAAGATTA
TCAAGCTGTTTCAAATTATTGACAGAATGATGACTTTACCTAATCCTTTACAACCCACATTCCGCGAGATATTTAA
GTCAATTTAATTTTCAACTAAATTGTTCTAAATAAAAGCCCAATGATTGCCATGTAATAATTTGGACTATTTTTT
AATGTAGAATAATAATTGCAGTAACCTGAACCAATAAAAAGATGAAAAACCCCTAGAAGCGATAGAAAATCGTAAA
TTTAGACCATTTAGGAATAGTAGCAGGCGTAATAGATGAGATGGAATTAGTAGAAGAAGTGAATAAAAAAGTGGG
ATTAAGAGCAAAAAGAAGCAGTAAGCCCAGGACAGGTAATGAAAGCAATGATTTTGAATGGATTAGGGTTTTTGAG
CGCGCCGCTGTACCTATTCGAGAACTTTTTCGTAGGGAAAGCAACAGAACATTTAATAGGAGAAAGGAGTAATAG
CAGAGCAACTAAATGATGACAGAATCGGGAGAGCATTAGATAAATATTATGAAGTAGGAAC

>66.4_Fwd

GTTTGAGCGCGCCGCTGTACCTATTCGAGAACCTTTTTCGTAGGGGAAAGCAACAGAACATTTAATAGGAGAAGGAG
TAATAGCAGAGCAACTAAATGATGACAGAATCGGGAGAGCATTAGATAAAATATTATGAAGTAGGAACAACAAATC
TATTCACAGCAATAGCCCTAAAAGCCGCCCAAAAATTCCAAGTAGAAAAGGAAAAGCGTACACCTAGATAGCAGTT
CGATATCAGTAGAGGGAGAATACAAAAGTAAAGAAGAAGAAAATCAGGAAATAGAAAGAAGAAATGAAAAGCCATAA
AAATAGTGCATGGATACTCAAGAGATAAAAGACCAGATCTGAAACAATTTATAATAGATATGGTAGTAAGCGGAG
ACGGAGATGTGCCATTATATCTAAAAATAGATGACGGAAACGCCGATGATAAAAGCGTATTTGTAGAAAAGACTAA
AAGAATTTAAAAAGCAATGGACATTTGAAGGAATATGTGTAGCAGACAGTGCATTATACACAGCAGAGAATATAG
GAGCAATGGCAGGAATGAAATGGATAACAAGAGTACCATTAAGTATAAAAGAAGCGCAAAAATAAGATTGTAGAGA
TAGAAGAGGAAGAATGGGAGCAGAGTCAAATAAAAGGATATAGAATAGCAACGAAATCAAGTGAGTACGCAACA
TAAAACAAAGATGGTTAGTAGTAGAAAAGTGAAGCCAGGAAAAAAGCAGCCCTAAAAAAAATATCAGAGCAAGTAG
AAAAACAGTTAGAGAACGCCAAAGCATCACTGCGGAAGCTATTGAAACAAGAGTATGCTTGCATAGCGGATGCAG
AGATTGGGATAAAAATGTTATCAGATTTCGTGGAAATATCACGAAATAAAAGAAAATAAAATGCACAGAAAAAGCCA
GTAAAAAAGCCAAAGTAAAACAGAAAAGGAATCAA

>66.5_Fwd

GATGCAGAGATTGGGATAAAAATGTTATCAGATTTCGTGGAAATATCACGAAATAAAAGAAAATAAAATGCACAGAA
AAAGCCAGTAAAAAAGCCAAAGTAAAACAGAAAAAGGGAATCAAGAAAAGACAATAGTTTATCAAGTAACAGGA
GAGATAGAACCTAGAGAATCAGTGATAGAAGCGGAAAAAATCAAAGCCGGAAGATTTATATTAGCGACAAATATA
TTAGACAAGAAAGAGGTGAGTAATGAAAAGCTATTAGCCGAATATAAAGCGCAGCAAAGTAACGAGAGAGGATTT
AGATTTTTTAAAGATCCGTTATTTTTTCACAGCAAGTGTATTTCGTGAAAAAACCAGAGAGAGTGGAAAGCAATAGCG
ATGATAATGGGATTGTGCTTGTTAGTGTATAACCTAGCTCAAAGAAAATTGAGAAAACAATTAGAAACAGCCCCAA
GAAGGGGTGAGGAATCAGGTCAAGAAAATCACGAATAAACCGACAATGCGGTGGATATTTCAAATGTTTCAAGCG
GTACATTTAGTCAGGATAAATGGGGAGAAACAAGTGAGTAACCTTAACCCAAGAACGTCAAGAAAATATTGCAGCAT
TTAGGGAAAGATTGCTGTCAATACTATTTAATGATTCTCTGGGGGATAAAGATTAAAAAGAAAGGGGGAAATAGTTG
TAAAAAATCTAAGTTATGAGTCAAGATGAGAACTCTTGGCTGAAAAGAATTTGGTGATAAAATACAAATATATTA
AAAAAATGGAGTTCTATTTCTATTAAAAAATAGTAATTATTTATGTTTAGTTAAATAGCGGTAAACTAGCTATAT
AATTTGATAGTAAAGCCTCGGAAGTTCACCGAAAAATTGGAATAGGTTTCTATTTTTTGAATTAGTGGAATTT
TGACCCCTATCTGCGGAATGTGGGTTACAAGAAAGTTTAGATTTTTAAATTCACAAAT

>66_Rev

GCCGAAGATTTATATTAGCGACAAATATATTAGACAAGAAAGAGGTGAGTAATGAAAAGCTATTAGCCGAATAT
AAAGCGCAGCAAAGTAACGAGAGAGGATTTAGATTTTTTAAAGATCCGTTATTTTTTCACAGCAAGTGTATTTCGTG
AAAAAACAGAGAGAGTGAAGCAATAGCGATGATAATGGGATTGTGCTTGTTAGTGTATAACCTAGCTCAAAGA
AAATTGAGAAAACAATTAGAAACAGCCCCAAGAAGGGGTGAGGAATCAGGTCAAGAAAATCACGAATAAACCGACA
ATGCGGTGGATATTTCAAATGTTTCAAGCGGTACATTTAGTCAGGATAAATGGGGAGAAACAAGTGAGTAACCTTA
ACCCAAGAACGTCAAGAAATATTGCAGCATTTAGGGAAAGATTGCTGTCAATACTATTTAATGATTCTCTGGGGGA
TAAAGATTAAAGAAAGGGGGAAATAGTTGTAAAAAATCTAAGTTATGAGTCAAGATGAGAACTCTTGGCTGAAA
AGAATTTGGTGATAAAATACAAATATATTAAAAAATGGAGTTCTATTTCTATTAAAAAATAGTAATTATTTATG
TTTAGTTAAATAGCGGTAAACTAGCTATATAATTTGATAGTAAAGCCTCGGAAGTTCACCGAAAAAATTGGAATAG
GTTTCTATTTTTTTAGAATTAGTGGAATTTGACCCCTATCTGCGGAATGTGGGTTACAAGAAAGTTTAGATTTT
AAAATTCACAAATTTGAGGAGGAAAGAACTATTTCTGTAAATAATTCTTTTTTCGTAACTAAAGTTAGAGTCATT
TTTGCTCCTAAATTAATGTGATGGTTTGAAGTTGTTTTTACCCATCCCTTATCGGCTAAATTCCTAGCCATTTTA
AGATTTTAGGGTCTTTATCATAGTGATAGGTAAGTCCATCATTTCCCGTAATGGATTTCCCCGACTGGCTAGGT
TTCTAATACTACTGACGGAATAGTTGCTATCTTTCTAGAAGATCT

>253_Rev

ACAAATACGCTTTTTATCATCGGCGTTTCCGTCATCTATTTTTTAGATATAATGGCACATCTCCGCTCTCCGCTTACT
ACCATATCTATTATAAATTGTTTCAGATCTGGTCTTTTATCTCTTGAGTATCCATGCATATTTTTTATGGCTTTC
ATTTCTTCTTCTATTTCTGATTTTCTTCTTCTTTACTTTTGTATTCTCCCTCTACTGATATCGAACTGCTATCT
AGGTGTACGCTTTTCTTTTCTACTTGGAATTTTTGGGCGGCTTTTAGGGCTATTGCTGTGAATAGATTTGTTGTT
CCTACTTCATAATATTTATCTAATGCTCTCCCGATTCTGTCAATTTAGTTGCTCTGCTATTACTCCTTCTCCT
ATTAAATGTTCTGTTGCTTTCCCTACGAAAAAGTTCTCGAATAGGTACAGCGGCGCGCTCAAAAACCTAATCCA
TTCAAATCATTGCTTTTCAATACCTGTCCTGGGCTTACTGCTTCTTTTGTCTTAATCCCCTTTTTTATTCACT
TCTTCTACTAATTCCATCTCATCTATTACGCTGCTACTATTCTAAATGGTCTAAATTCAGATTTCTATCGCT
TCTAGGGGGTTTTTTCATATTTTTTATTTGTTTCAGCTACTCTAATTATTATTCTACATTGAAAAATAGCCCAAATGAT
TGCCATATAATGATTTGGGCTTTTTATTTATTCCAATTTAATTGGCAATTCATTGGCTTAAATATCTGCGGAATG
TGGGTTAAATTCACAAATTTGAGGAGGAAAGAACTATTTCTGTAAATAATTCTTTTTTCGTAACTAAAGTTAGA
GTCATTTTTGCTCCTAAATTAATGTGATGGTTTGAAGTTGTTTTTACCCATCCCTTATCGGCTAAATTCCTTAGCC
ATTTTAAGATTTTAGGGTCTTTATCATAGTGATAGGTAAGTCCATCATTTCCCGTAATGGATTTCCCCGACTGG
CTAGGTTTCTAATACTACTGACGGAATAGTTGCTATCTTCT

>253_Fwd

TGCTCGAGTTTTTTCAGCAAGATCCCAACAATTTGATGTGATTTTTGGCAGGGAATATGTTTGGGGACATTCTCAGT
GATATTGGTGGAGCGTTGGTAGGTTCAATTGGATTATTGGGATCGGCCAGTCTCAATAACCAGGGTTTTGGGGATG
TATGAAGCCATTTCATGGAAGTCCCCAGATATTGCTGGCAAGGGTATTGCCAACCCCTGGGTACTCTAGCGGGT
TGTGTTTTGATGCTACAACAATGGGGAGAAATCAAGGCAGCCCAACGGATTCTCAAGGCCCAGGAGCGACTGTTA
GGCAAAGGATACCGCACCGCCGATTGTTCCCTCAAAACCACGAACTTTGGTCAATACGGCTACCCCTCGTTGAC
CTATTCCTTGAAGAAATTTCCCTTGAACAACCTACTGAATAATGAGTTTAATCCATGACTGATGCTAACAAAATC
CTCTACCTGGGAAATGATATTAATACTGACGATATTATTCCCCTAAAAGAGGGACTAATGATGATCCAGACCAC
TTAAACAATATGCTTTAGAACACATCATTGGCGTGGGAGAACTACTACAATATGATGAGATCGAAGCAGGGAAT
AATTTTGGCTGTGGATCAAGTCGAGAAATTGCCCCATTGCCCTAAAAGCGGCTGGCATCAAAAAAGTTAAAGCG
CGATCGTTCCCGAAATTTTCTATCGCAATAGTATTAATATTGGACTCCCCTTAGAAATTATTGGGGAGACGGAA
CAAAACCTGTGGTAGAAGCGATCGCCACTGCTGGGGGATTAATGGCCTTTAATCAAAAGCGTCGTCAAGGCAAG
GTTAAAATTCCGCTAGTGTACCCCTGCCCGTCCCATGACCAGGGTGGAAAAGATGTTAGCAAAAAGCTTCGGGC
AATGATTATGTGAAACCAGGGGAAAGGGTGTGTGCCAAGATTGATCTGGCTTTATCCCATGACGCGGTGGCTAGT
TCGGTCGCGAAGGTATTTTATGACATT

>253.2_Fwd

TGCCGTCCATGACCAGGGTGGAAAGATGTTAGCAAAAGCTTCGGGCAATGATTATGTGAAACCAGGGGAAGGGGT
GTTTGCCAAGATTGATCTGGCTTTATCCCATGACGCGGTGGCTAGTTTCGGTCGCGAAGGTATTTTATGACAATTA
TGGAACCAACCGCCCAATTATGGGATCCGCAACGGGTGGTATTAGTCGCTGATCACTTTATCCAAATTAATGACAT
TCGCCTTGATAACAAAGCCCCGGTTATGTATGAGCAGATGGTCAAATTTGCCCAAGCTCAAGGCTGTCATCTGTT
GGATGTCTGTCTCCAGGGGAAGCGGCTGGTATCTGTCATGTGTTGCTCCCAGAACAGGGATTTATTCGCCCCGG
AATGATCATTGCAGGAACGGACTCCCATACCTGTACCTATGGAGCTTTAGGAGCCTTTTCCACAGGGGTGGGAAC
CACAGATATGGCCAATATTTTTGCAATGGGGGATATGTGGATACGAGTCCCACCCACTTTGGTGTTTGAGTTATC
GGGAACCTTCCCTCCTCAGATTAGTGCCAAGGATATTATCTTATTTATTCTGGGCAAAATGGGCTGTGGGGGAGC
CACCAGCAAAGTCATGGAATTTTCGCGGCTCTATCATTGAACAATTGCCCTTAGATGAACGCCTGACCTTGCTAA
TATGGCCATTGAATGTGGTGCCATGTGTGGTTTAATTGCGGCAGATGAAGTGACAAACGATTATGTTACCAGTCG
CACACCAATCGGGTTTGAAGACGCGTGCAGGAGCGTGCCTTTGGCATCGCTGACCCCGATGCCGAGTATGAGGC
TGTTTATCAATTCGATCTGAGCCATTTGGAACCCAGGTTGCCCGTCCCCCTAAACCAGATCAGGTAGTTAACAT
TAGTCAATTAGAAGATGTTCCCATCACCAAAGCTTTTATTGGCTCTTGT

>253.3_Fwd

GTTCCCATCACCAAAGCTTTTATTGGCTCTTGTACTGGCGGAACCTCTACGATCTCGCTCAAGCGGCGGCTGTATT
AAAAGATCGTCGGGTGCCCAGGGGGTAGATTTATTCGTAGTGCCAGCTTCAATGGAGGTACGTCAAAAAGCCGA
AGAATTGGGCTATCTTGCTATTTTTGAAGAATCTGGGGCGCAACTGCTCAAATCTGGTGTGGAGCTTGTATTAA
TTCAGGAAAGGGAGTATTAGACAAGGAAGAAACGGGAGTCTATGCCACCAATCGTAATTTTAAAGGACGTAGTGG
CGACCCTACCGCTAAAAATTATTTGGCTTCCCCTAGAACTGTGCAATTTAGCTATTAAAGGAAAAATTACTGC
CAATCTTGATTAATACTTTTTCTGTTGACATCCTCTCCGCCGTAGAACTTGGAAGTGGTCTTTAATTCGAGGGTTG
TATGATCGGGGCTTAACGAGAGAAAAAGATTATCAAGCTGTTTCAAATTATTGACAGAATGATGACTTTACCTAAT
CCTTTACAAGAAAGTTTAGATTTTTAAACCCACATTCCGCAGATAGGGGTCAAATTTTCCACTAATTCTAAAAAA
TAGAAACCTATTCCAATTTTTCGGTGAACCTCCGAGGCTTTACTATCAAATTATATAGCTAGTTTACCCTATTT
AACTAAACATAAATAATTACTATTTTTTAATAGAAATAGAACTCCATTTTTTTAATATATTTGTATTTTATCACC
AAATTCTTTTCAGCCAAGAGTTCTCATCTTGACTCATACTTAGATTTTTTACAATATTTCCCCCTTTCTTTTA
ATCTTTATCCCCCAGGAATCATTAAATAGTATTGACAGCAATCTTCCCTAAATGCTGCAATATTTCTTGACGTT
CTTGGGTAAAGTTACTCACTTGTCTTCTCCCATTTATCCTGACTAAATGTACCGCTTGAAACATTTGAAATATCC
ACCGCATTGTGCGTTTTATTCTGATTTTCTTGACCTGATTCTCACCCCTTCTTGGGCTGTTTCTAATT

>253.4_Fwd

ACTAATGTACCGCTTGAACATTTGAAATATCCACCGCATTGTGCGTTTTATTTCGTGATTTTTCTTGACCTGATTCCCT
CACCCCTTCTTGGGCTGTTTTCTAATTGTTTTCTCAATTTTTCTTTGAGCTAGGTTATACACTAACAAGCACAAATCC
CATTATCATCGCTATTGCTTCCACTCTCTCTGGTTTTTTCACGAATACACTTGCTGTGAAAAATAACGGATCTTT
TAAAAATCTAAATCCTCTCTCGTTACTTTGCTGCGCTTTATATTTCGGCTAATAGCTTTTCATTACTCACCTCTTT
CTTGCTAATATATTTGTCGCTAATATAAATCTTCCGGCTTTGATTTTTTCCGCTTCTATCACTGATTCTCTAGG
TTCTATCTCTCCTGTTACTTGATAAACTATTGTCTTTTCTTGATTCCCTTTTTCTGTTTTACTTTGGCTTTTTTT
ACTGGCTTTTTCTGTGCATTTTTATTTCTTTTATTTTCGTGATATTTCCACGAATCTGATAACATTTTTATCCCAAT
CTCTGCATCCGCTATGCAAGCATACTCTTGTTCATAGCTTCCGCAGTGATGCTTTGGCGTTCTCTAACTGTTT
TTCTACTTGCTCTGATATTTTTTTTTAGGGCTGCTTTTTTCTGGCTTCACTTTCTACTACTAACCATCTTTGTTT
TATGTTTGGTACTCACTTGATTTTCGTTGCTATTCTATATCCTTTTTATTTGACTCTGCTCCCATTCTTCTCTTC
TATCTCTACAATCTTATTTTGGCTTCTTTTATACTTAATGGTACTCTTGTATCCATTTTCATTCTCGCCATTGC
TCCTATATTCTCTGCTGTGTATAATGCACTGTCTGCTACACATATTCCTTCAAATGTCCATTGCTTTTTTAAATTC
TTTTAGTCTTTCTACAAATACGCTTTTATCATCGGCGTTTCCGTCATCTATTTTTAGATATATG

Anhang E *mvdB* IGS Region Sequenzen

>mvdBDel1277

ATTTCCAGATAATAAGTCTCTGTATGTTGTAATATTTTATCCTAGAAGTTTGGTTGATAAAATCTCGCCATTTTTT
TTAACAACTTAGTTTCAAATTTCCCCTTTTAAAGCTATGCTTAAAGCAAAATTAAAAATCGAAATTACGGAGAAA
ATAGTTGT

>mvdBDel1757

ATTTCCAGATAATAAGTCTCTGTATGTTGTAATATTTTATCCTAGAAGTTTGGTTGATAAAATCTCGCCATTTTTT
TTAACAACTTAGTTTCAAATTTCCCCTTTTAAAGCTATGCTTAAAGCAAAATTCAAATCGAAATTACGGAGAAA
ATAGTTGT

>mvdBDel1804

ATTTCCAGATAATAAGTCTCTGTATGTTGTAATATTTTATCCTAGAAGTTTGGTTGATAAAATCTCGCCATTTTTT
TTAACAACTTAGTTTCAAATTTCCCCTTTTAAAGCTATGCTTAAAGCAAAATTCAAATCGAAATTACGGAGAAA
ATAGTTGT

>mvdBDel1840

ATTTCCAGATAATAAGTCTCTGTATGTTGTAATATTTTATCCTAGAAGTTTGGTTGATAAAATCTCGCCATTTTTT
TTAACAACTTAGTTTCAAATTTCCCCTTTTAAAGCTATGCTTAAAGCAAAATTAAAAATCGAAATTACGGAGAAA
ATAGTTGT

>mvdBDel11459.36

ATTTCCAGATAATAAGTCTCTGTATGTTGTAATATTTTATCCTAGAAGTTTGGTTGATAAAATCTCGCCATTTTTT
TTAACAACTTAGTTTCAAATTTCCCCTTTTAAAGCTATGCTTAAAGCAAAATTAAAAATCGAAATTACGGAGAAA
ATAGTTGT

>mvdBDel1779

ATTTCCAGATAATAAGTCTCTGTATGTTGTAATATTTTATCCTAGAAGTTTGGTTGATAAAATCTCGCCATTTTTT
TTAACAACTTAGTTTCAAATTTCCCCTTTTAAAGCTATGCTTAAAGCAAAATTAAAAATCGAAATTACGGAGAAA
ATAGTTGT

>CYA34

AtttccagataataagtctctgtatgttgtaatatTTTTATCCTAGAAGTTTGGTTGATAAAATCTCGCCATTTTTT
ttaacaacttagtttcaaattcccctTTTTAAAGCTATGCTTAAAGCAAAATTAAAAATCGAAATTACGGAGAAA
atagttgt

Anhang F *mvd* Precursor Sequenzen

>6.89 Typ2

```
CAGATCATCCCGAATTCATGCCAATAATAACTACCTTTTTCTCCTGATAGCGACTCAAACATTATTTTCTCCTGGG
TATCAAAATATAAACTACTTTAACTTAATATTTAAACAAAAATCGGGAGTAGCTTTCAGTTATTAAATAACTAC
TACTCCCTTAATTTTCGATCAAGATGGCTCTGGTCTACTTAACTATCTTCAAAATCGGAAGGCCACTTGAAAAGTC
CAGACCGGGATATCGGTAGAAGTGGAACCAAGTTTCTGTGTCTTGCTCTGACAAGAAACGAGCAAAGAAGGGG
ACTGCTGATCCGGTCGATACTTTGATATTTTAGACATAGTAGTTTACTTTTCAGAAAGATAATTGCTGGGATTC
TATCACGAATCGACCCAATATAGCAAGTCTAAATCAATTGTATAAGTAGTTTGATATCCAATCTTAAAAAATCA
AGCAATCAAATAGGGAGTAGCTTTTAGTTATTAATAAATACTGCTACTCCCTTAAATTGTGGATTAAGATTGCTCTT
ATCTATTTAATAATCTTCCCAATCGGAAGGATACTTATAAGTACTACCGTAAGGAGCAGAATTAGAATTGTTAGC
TTCCACGGCTTGCTCTGCTAAGAAACGAGCAAAGAAGGGGACTGCTGTGGGCGCAGAGACTTTAACATTTTGA
CATGAGTTAAGTTCTTTTGCAATATTGACCTGCGACCAAGATACTACGGACGAACAGGATATGTCAAGGGAAAT
CCAGAACAAATGATTAACCTTTTATTAATAAAGTATCCTGAATCACTAAGATGGTTTCTGGTTTGTAGGAGTAAGC
AGAATTTTCAGCGATCGATCTTTCTAGAAGATCTCCTACATATTCTCAGCTGCAT
```

>83/2 Typ1

```
GTTTTTCAGCAGATCGATCGCTGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATA
AAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTT
TGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCT
CTGCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTT
CCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACT
AAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATG
TTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTTCTAGAAGATCTCCTACA
ATATTCTCAGCTGCCATGGATACAAA
```

>166 Typ1

```
TCAGCAGATCGATCGCTGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAG
TTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGA
AAAGTAACTACTATTTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTC
AGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGA
TTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAA
GCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTG
AGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATAT
TCTCAGCTGCCATGGAAT
```

>170 Typ1

```
CAGCAGATCGATCGCTGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGT
TAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAA
AAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTC
GAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGAT
TGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAA
CTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTGA
GTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATT
CTCAGCTGCCATGGATCC
```

>178 Typ1

```
GCTGGCTTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGAGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTAC
TATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACAC
AGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAG
TTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGAT
TTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTA
```

>259 Typ3

TACCTACAAACCAGAAACCATTTTGTAGTGATTTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTTGGTTCGCAGGTCAATATTGCAAAAAGGAACCTTAAGTATGATGTCCTTGAAGTCTCTGCGCCCCAAAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAA
CAATTCTAATTCTGCTCCTTTCTCTACTTTATAAGTATCCTTCCGATTTTGAAGATTTTTTAAATAGATAAGAGCAA
TCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGACTTTT
TTAACAAAAGTTATCAATTTAAGGTATTTAATATACTTGACAATCCCTGCTGATTGTGAATAACTATCCGTCCTA
AATTTCCCTAGATTATTGGGTAAAAATTTACTTGACATATCTGGTCACTACTGATAGGATTTTAAACAATTAAATTT
CTGGAAAGGAACCTTAAGTATGCTCTAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCCAAAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTT
CTTAGCGGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAATTTCTAATTTCTGCTCCTTACGGTAATACTATGAAGTATCCTTCCGA
TTGGGAAGAATATTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAA
GCTACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATATCAAACTACTTATACAATTGATTTAGACTTGCT
ATATTGGGTGCGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAA
GGTATCGACCGGATCAGCCGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTAC
TTCTACCGATATCCCCACGGTCTGGACTTTCAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATTGTTAAGTAGACCAGAGCCA
TCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAG
TTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTA
TTGGCATGAATTCGGGATGCATCT

>281 Typ3

GATCGATCGCTGAAATTCTGCTCACATACCTACAAACCAGAAACCATTTTGTAGTGATTTCAGGATACTTTTTTAATA
AAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTTGGTTCGCAGGTCAATATT
GCAAAAAGGAACCTTAAGTATGTCCTAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCCAAAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTT
TTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAATTTCTAATTTCTGCTCCTTTCTCTACTTTATAAGTATCCTTCCGATTTT
GAAGATTTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCT
ACTCCCTATTTGATGGCTTGACTTTTTTAAACAAAAGTTATCAATTTAAGGTATTTAATATACTTGACAATCCCTG
CTGATTGTGAATAACTATCCGTCTAAATTTCTAGATTATTGGGTAAAAATTTACTTGACATATCTGGTCACTA
CTGATAGGATTTTTAACAATTAATTTCTGGAAGGAACCTTAAGTATGCTCTAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCC
AAAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTTCTTAGCGGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAATTTCTAATTTCTGCTCCTTAC
GGTAATACTATGAAGTATCCTTCCGATTGGGAAGAATATTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCGAAAATTAAGG
GAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATATCAAACT
ACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTATATTGGGTGCGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAG
TAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCCGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTTCTTGTCAGAG
CAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGGTCTGGACTTTCAAGTGGCCTTCCGATTGG
GAAGATTGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCTA
CTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTC
GCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGATGCAGTG

>354 Typ3

CTACCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGA
CATATCCGGTTCATCAGTAGTATCTTGGTTCGCAGGTAAATATTGCAAAAAGGAACCTTAAGTATGATGTCCTTGA
TAAAGTCTCTGCGCCCCAAAGCTGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTC
TAATTTCTGCTCCTTTTCGATACTCGTAAGTTTCCTTCCGATTGGGAAGACTCCTGGTAGAGACGTCGCCAGATATA
AATAGAGTCGCACCTACTACAACCTCGGAAGTATCCTTGCATTTGGAAGATTTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTT
AATCTACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGACTTTTTTAA
CAAAAGTTATCAATTTAAGGTATTTAATATACTTGACAATTTCTGTTAATTGTGAATAACTATCCGTCCCTAAATG
TCCTAGATTATTGGGTAAAAATTTCTTGACATATCTGGTCACTACTGATATAGTCCTTAACAATTAAATTTAG
GAAAGGAACCTTAAGTATGTCCTAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCCAAAGCTGTTCCCTTCTTTGCTCGTTTTCTT
AGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTTCTACTCCTTTTATTGGTACTTATAAGTATCCTTCCGATTT
TGAAGATGCTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGC
TACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACTACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTAT
ATTGGGTGCGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAG
TATCGACCGGATCAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTG

>364 Typ3

CACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTG
ACATATCCGGTTCATCAGTAGTATCTTGGTCGCAGGTTAATATTGCAAAAGGAACCTTAACATCATGTCCAAAAATG
TTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCTGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTT
CTAATTCTGCTCCTTTTCGATACTCGTAAGTTTCTTCCGATTGGGAAGACTCCTGGTAGAGACGTCGCCAGATAT
AAATAGAGTCGCACCTACTACAACCTCGGAAGTATCCTTGCGATTTGGAAGATTTTAAATAGATAAGAGCAATCT
TAATCTACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGACTTTTTTA
ACAAAAGTTATCAATTTAAGGTATTTAATATACTTGACAATTCTTGTTAATTGTGAATAACTATCCGTCCTAAAT
TTCCTAGATTATTGGGTAAAAATTTCCCTTGACATATCTGGTCACTACTGATATAGTCTTAACAATTAAATTTATG
GAAAGGAACCTTAACATCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCTGTTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTT
AGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTACTCCTTTTCATTGGTACTTATAAGTATCCTTCCGATTT
TGAAGATGCTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGC
TACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTAT
ATTGGGTGCGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAG
TATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTT
CTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATC
TTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAACTACTCCCTATTTTGTTTAAATACTAAGTT
AAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATT
GGCATGAATTCGGGATGCATCTT

>371 Typ2

TGAGAATATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGA
TTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCGGTTCATCAGTAGTAT
CTTGGTCGCAGGTTAATATTGCAAAAGGAACCTTAACATCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCTG
TCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTGCTCCTTTTCGATACTC
GTAAGTTTCTTCCGATTGGGAAGACTCCTGGTAGAGACGTCGCCAGATATAAAATAGAGTCGCACCTACTACAAC
TCGGAAGTATCCTTGCGATTTGGAAGATTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCTACAATTTAAGGGAGTAGC
AGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTACTTATA
CAATTGATTTAGACTTGCTATATTGGGTGCGATTCTGATATAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAACTA
CTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAATAGAGCAAGACA
CAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGGTCTGGACTCTGAAATGGCCTTCCGATTGGGAAGATA
GTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCTACTCCCGA
TTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCA
GGAAAAAAGGTAGTTATTAGT

>372 Typ2

GTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCGGTTCATCAGTA
GTATCTTGGTCGCAGGTTAATATTGCAAAAGGAACCTTAACATCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAA
GCTGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTGCTCCTTTTCGAT
ACTCGTAAGTTTCTTCCGATTGGGAAGACTCCTGGTAGAGACGTCGCCAGATATAAAATAGAGTCGCACCTACTA
CAACTCGGAAGTATCCTTGCGATTTGGAAGATTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCTACAATTTAAGGGAG
TAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTACT
TATACAATTGATTTAGACTTGCTATATTGGGTGCGATTCTGATATAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAA
ACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAATAGAGCAA
GACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGGTCTGGACTCTGAAATGGCCTTCCGATTGGGAA
GATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCTACTC
CCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCT
ATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTGCTG

>384 Typ3

ATATCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGA
TTTCCCTTGACATATCCGGTTCATCAGTAGTATCTTGGTCGCAGGTTAATATTGCAAAAGGAACCTAACTCATGT
CCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCCAAAGCTGTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAG
CTAACAGTTCTAATTCTGCTCCTTTTCGATACTCGTAAGTTTCCTTCCGATTGGGAAGACTCCTGGTAGAGACGTC
GCCAGATATAAATAGAGTCGCACCTACTACAACCTCGGAAGTATCCTTGGCATTGGAAGATTTTTAAATAGATAA
GAGCAATCTTAATCTACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTG
ACTTTTTTAACAAAAGTTATCAATTTAAGGTATTTAATATACTTGACAATTCTTGTTAATTGTGAATAACTATCC
GTCTAAATTTCCCTAGATTATTGGGTAAATTTCCCTTGACATATCTGGTCACTACTGATATAGTCTTAACAATT
AAATTTATGGAAGGAACCTAACTCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCAAAAGCTGTTCCCTTCTTTGC
TCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTACTCCTTTTCATTGGTACTTATAAGTATCC
TTCCGATTTTGAAGATGCTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATA
ACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTACTTATACAATTGATTAG
ACTTGCTATATTGGGTGCTGATTGCTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAA
ATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTGAGAGCAAGACACAGAACTGGTG
ATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACC
AGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTTGTTTAAA
TACTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTA
GTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTG

>394 Typ2

TTTCAGCAGATCGATCGCTGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAA
AGTTAATCATTTTTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCGGTTCGTCCGTAGTATCTTGGTCGCAGGTCAATATTGC
AAAAGGAACCTAACTCATGTCTAAAAACGTTAAAGTCTCTGCGCCCCAAAGCTGTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTT
AGCAGAACAAAGCCGTGGAAGCTAACAAATTCTAATTCTGCTCCTTACGCTAATACTATGAAGTATCCTTCCGATTG
GGAAGAACAGTTCTAATTCTACTCCTTTTCATTGGTACTTATAAGTATCCTTCCGATTTTGAAGATGCTTAAATAG
ATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATTG
CTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTTATAACAATTGATTTAGACTTGCTATATTGGGTGCTGATTCGTGA
TATAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCA
GTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAATAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACG
GTCTGGACTCTGAAATGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAAATTAAGG
GAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCTACTCCCGATTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTG
TGATCCCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGA
TCTTTCTAGAGATCTC

>405 Typ3

ACTACAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATA
TCCGGTTCATCAGTAGTATCTTGGTCGCAGGTTAATATTGCAAAAGGAACCTAACTCATGTCCAAAAATGTTAAA
GTCTCTGCGCCCCAAAGCTGTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAAT
TCTGCTCCTTTTCGATACTCGTAAGTTTCCTTCCGATTGGGAAGACTCCTGGTAGAGACGTCGCCAGATATAAATA
GAGTCGCACCTACTACAACCTCGGAAGTATCCTTGGCATTGGAAGATTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATC
TACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGACTTTTTTAACAAA
AGTTATCAATTTAAGGTATTTAATATACTTGACAATTCTTGTTAATTGTGAATAACTATCCGTCTAAATTTCCCT
AGATTATTGGGTAAATTTCCCTTGACATATCTGGTCACTACTGATATAGTCTTAACAATTAAATTTATGGAAAAG
GAACCTAACTCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCAAAAGCTGTTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAG
AGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTACTCCTTTTCATTGGTACTTATAAGTATCCTTCCGATTTTGAAG
ATGCTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTC
CCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTACTTATAACAATTGATTTAGACTTGCTATATTGG
GTCGATTGCTGATATAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCG
ACCGGATTAGCCGTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAACAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACC
GATATCCCCCGGTCTGGACTTGGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGAGCCATCTTGATCGAAA
ATTAAGGGAGTAGCCAATAACTAAAAGCTACTCCTAATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATT
TGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGATG
CATAC

>406 Typ3

CCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACAT
ATCCGGTTCATCAGTAGTATCTTGGTCGCAGGTTAATATTGCAAAAAGGAACCTAACTCATGTCCAAAAATGTTAA
AGTCTCTGCGCCCAAAGCTGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAA
TTCTGCTCCTTTTCGATACTCGTAAGTTTCCTTCCGATTGGGAAGACTCCTGGTAGAGACGTGCGCAGATATAAAAT
AGAGTCGCACCTACTACAACCTCGGAAGTATCCTTGCGATTTGGAAGATTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAAT
CTACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGACTTTTTTAACAA
AAGTTATCAATTTAAGGTATTTAATATACTTGACAATTCTTGTTAATTGTGAATAACTATCCGTCCTAAATTTCC
TAGATTATTGGGTAAAAATTTCCCTTGACATATCTGGTCACTACTGATATAGTCTTAACAATTAATTTATGGAAA
GGAACCTTAACCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCAAAAGCTGTTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCA
GAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTACTCCTTTTCATTGGTACTTATAAGTATCCTTCCGATTTTGAA
GATGCTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACT
CCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTATATTG
GGTCGATTTCGTGATATAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATC
GACCGGATTAGCCGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAACAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTAC
CGATATCCCCCGGTCTGGACTTGGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGAGCCATCTTGATCGAA
AATTAAGGGAGTAGCCAATAACTAAAAGCTACTCCTAATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTATATT
TTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAT
GATAC

>550 Typ3

TAACAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATAT
CCGGTTCATCAGTAGTATCTTGGTCGCAGGTTAATATTGCAAAAAGGAACCTAACTCATGTCCAAAAATGTTAAAG
TCTCTGCGCCCAAAGCTGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATT
CTGCTCCTTTTCGATACTCGTAAGTTTCCTTCCGATTGGGAAGACTCCTGGTAGAGACGTGCGCAGATATAAAATAG
AGTCGCACCTACTACAACCTCGGAAGTATCCTTGCGATTTGGAAGATTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCT
ACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGACTTTTTTAACAAAA
GTTATCAATTTAAGGTATTTAATATACTTGACAATTCTTGTTAATTGTGAATAACTATCCGTCCTAAATTTTCCTA
GATTATTGGGTAAAAATTTCCCTTGACATATCTGGTCACTACTGATATAGTCTTAACAATTAATTTATGGAAAGG
AACTTAACCTCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCAAAAGCTGTTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGA
GCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTACTCCTTTTCATTGGTACTTATAAGTATCCTTCCGATTTTGAAGA
TGCTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCC
CTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTATATTGGG
TCGATTTCGTGATATAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGA
CCGGATTAGCCGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAACAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCG
ATATCCCCCGGTCTGGACTTGGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGAGCCATCTTGATCGAAAA
TTAAGGGAGTAGCCAATAACTAAAAGCTACTCCTAATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTATATTTT
GATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGATGA
GAC

>551 Typ3

ACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATAT
CATATCCGGTTCATCAGTAGTATCTTGGTCGCAGGTTAATATTGCAAAAAGGAACCTAACTCATGTCCAAAAATGT
TAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCTGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCT
TAATTCTGCTCCTTTTCGATACTCGTAAGTTTCCTTCCGATTGGGAAGACTCCTGGTAGAGACGTGCGCAGATATA
AATAGAGTCGCACCTACTACAACCTCGGAAGTATCCTTGCGATTTGGAAGATTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTT
AATCTACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACCTAAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGACTTTTTTA
ACAAAAGTTATCAATTTAAGGTATTTAATATACTTGACAATTCTTGTTAATTGTGAATAACTATCCGTCCTAAAT
TTCCTAGATTATTGGGTAAAAATTTCCCTTGACATATCTGGTCACTACTGATATAGTCTTAACAATTAATTTTATG
GAAAGGAACCTAACTCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCAAAAGCTGTTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTT
AGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTACTCCTTTTCATTGGTACTTATAAGTATCCTTCCGATTT
TGAAGATGCTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGC
TACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTAT
ATTGGGTGCGATTTCGTGATATAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGG
TATCGACCGGATTAGCCGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAACAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTT
CTACCGATATCCCCCGGTCTGGACTTGGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGAGCCATCTTGAT
CGAAAATTAAGGGAGTAGCCAATAACTAAAAGCTACTCCTAATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTAT
TATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCG
GGAGATCC

>554 Typ3

CTCACTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGA
CATATCCGGTTCATCAGTAGTATCTTGGTTCGCAGGTTAATATTGCAAAAAGGAACCTTAACCTCATGTCCAAAAATGT
TAAAGTCTCTGCGCCCCAAAGCTGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTC
TAATTCTGCTCCTTTTCGATACTCGTAAGTTTCCTTCCGATTGGGAAGACTCCTGGTAGAGACGTCGCCAGATATA
AATAGAGTCGCACCTACTACAACCTCGGAAGTATCCTTGCATTTGGAAGATTTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTT
AATCTACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGACTTTTTTAA
CAAAAGTTATCAATTTAAGGTATTTAATATACTTGACAATTCTTGTTAATTGTGAATAACTATCCGTCCTAAATT
TCCTAGATTATTGGGTTAAAATTTCCCTTGACATATCTGGTCACTACTGATATAGTCTTAACAATTAAATTTATGG
AAAGGAACCTTAACCTCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCAAAAGCTGTTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTA
GCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTACTCCTTTTCATTGGTACTTATAAGTATCCTTCCGATTTT
GAAGATGCTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCT
ACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTATA
TTGGGTCGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAGT
ATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTGAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTC
TACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCT
TGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTTGTGTTAAATACTAAGTTA
AAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTG
GCATGAATTCGGGACGC

>496/1 Typ3

TACACTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGA
CATATCCGGTTCATCAGTAGTATCTTGGTTCGCAGGTTAATATTGCAAAAAGGAACCTTAACCTCATGTCCAAAAATGT
TAAAGTCTCTGCGCCCCAAAGCTGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTC
TAATTCTGCTCCTTTTCGATACTCGTAAGTTTCCTTCCGATTGGGAAGACTCCTGGTAGAGACGTCGCCAGATATA
AATAGAGTCGCACCTACTACAACCTCGGAAGTATCCTTGCATTTGGAAGATTTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTT
AATCTACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGACTTTTTTAA
CAAAAGTTATCAATTTAAGGTATTTAATATACTTGACAATTCTTGTTAATTGTGAATAACTATCCGTCCTAAATT
TCCTAGATTATTGGGTTAAAATTTCCCTTGACATATCTGGTCACTACTGATATAGTCTTAACAATTAAATTTATGG
AAAGGAACCTTAACCTCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCAAAAGCTGTTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTA
GCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTACTCCTTTTCATTGGTACTTATAAGTATCCTTCCGATTTT
GAAGATGCTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCT
ACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTAT
ATTGGGTCGATTTCGTGATATAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAG
TATCGACCGGATTAGCCGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAACAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTT
CTACCGATATCCCCCGGTCTGGACTTGGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGAGCCATCTTGAT
CGAAAATTAAGGGAGTAGCCAATAACTAAAAGCTACTCCTAATTTTTGTGTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTA
TATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCG
GGTGAT

>365 Typ3

AAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCGGTTCATCAGTAGTATCTTGGTTCGCAGGTTAATATTG
CAAAAGGAACCTTAACCTCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCAAAAGCTGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCT
TAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTGCTCCTTTTCGATACTCGTAAGTTTCTTCCGATTGGG
AAGACTCCTGGTAGAGACGTCGCCAGATATAAATAGAGTCGCACCTACTACAACCTCGGAAGTATCCTTGCATTT
GGAAGATTTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCTACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTAAAAGC
TACTCCCTATTTGATGGCTTGACTTTTTTAAACAAAAGTTATCAATTTAAGGTATTTAATATACTTGACAATCTT
GTTAATTGTGAATAACTATCCGTCCTAAATTTCCCTAGATTATTGGGTTAAAATTTCCCTTGACATATCTGGTCACT
ACTGATATAGTCTTAACAATTAAATTTATGGAAAGGAACCTTAACCTCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCC
AAAAGCTGTTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTACTCCTTT
CATTGGTACTTATAAGTATCCTTCCGATTTTGAAGATGCTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAA
GGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAA
CTACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTATATTGGGTCGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAA
AGTAAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTGAG
AGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATT
GGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAAC
TACTCCCTATTTTTGTGTTAAATACTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAATAATGTT

>808 Typ2

AGACATTATTTTCTCCTGGGTATCAAAATATAAACTACTTTAACTTAATATTTAAACAAAAATTAGGAGTAGCT
TTTAGTTATTGGCTACTCCCTTAATTTTCGATCAAGATGGCTCTACTTAACTATCTTCCCAATCGGAAGGCCACT
TCCAAGTCCAGACCGGGGCCGGGATATCGGTAGAAGTAGAATCACCAGTTTCTGTGTCTTGCTCTGTAAAGAAAC
GAGCAAAGAAGGGGACGGCTAAGTCGGTCGATACTTTGATATTTTATAGACATAGTAGTTTACTTTTCAGAAAGCT
AATTGCTGGGATTGTATCACGAATCGACCAGATATGGCAAGACTTACCTAAAGACCTACCGCCCTATTCCACCGT
TTAAGTAGGTGGTCATAATTAAAGTTAAATACTAAAAGCTGTAAGTTCTTCAGGATAATGATTTCAGCTTTCCG
TTTGTGTGACGTTATTTATGCCCACCTACTTATAAAAAAATTGATGATTGATGAAATTGTCGGTAAACGCATTTTA
ATCCCCACACAATTTACGGGAATTGTTACCGTTGAAACTGCTGACCTGATAGACGATACCAAGCTACTACTAAAC
TGGAGTAAACGACAACGCCATCTAATCAAAATATGCCAGATCAAAGAATGCCGAATTTATACATGATTGTGGTG
CAAATGGGTGAGGGAAAACACCGCCGCTTTACAAATTCTCCCCAACTTCCTAGAAGTATTTCAATATGTAAATG
CCGATGAAATTGCTGCGGGACTTTCTCCCTTTAATTCTGAATCCGTAGCGATTCAAGCCGGACGATTAATGTTAG
AAAGATTAGAACTTTAGTTAATAATCGAGTTGATTTTGTCTTTTGAAGTACTTTAGCAACTCGCAGTTATGCCC
GTTTTTTGAGAACTGTAAAAATAAGCTTATCAAATAAACTTAATTTATTTTGGTTACAAAGCCCGGAATTAG
CAATCGCAAGAGTACGCAGACGGGTAGAAAGCGGGGGTCACAATATCCAGAAGATGTCATTCGCCGCCGTTATG
AACGGGGACGGAAAAACCTGACTGATTTGTATTTATGTTTATGCGATACTTGATAGTCTACGATAATTCTGGGA
CTAGCCCTCAATTAGTAGCCACATTAGGAAATAACCAAGAGGTAATAATTTATGAACCCGCCACCTGGAATCAAA
TCACCCTCCGAGAATAACCTCCAAATTCCCCTAACAGAAGTTCATCAAAAAATTGATGCTGGGGTTAAAGTTGCT
ATTGCTAAAGCCCTAGATAAACATCGGAAATTAGGGGAATCTATCAGTGTTTGGCAAGATGGAAGGTTATCACG
TTAAATGCAGAGGAAATTCCTCAGCCTCCATCAAATTAATTAATACTTTTATTAAGGAGTCAAGCCATCAAA
TAGGGAGTAGCTTTTAGTTATTAATAAAGTCTACTCCCTTAAATTTGTAGATTAAAGATTGCTCTTATCTATTTAA
AAATCTTCCAAATCGCAAGGATACTTCCGAGTTGTAGTAGGTGCGACTCTATTTATATCTGGCGACGCTCTTACC
AGTCTTCCCAATCGGAAGGAACTTACGAGTATCGAAAGGAGCAGAATTAGAACTGTTAGCTTCCACGGCTTGCT
CTGCTAAGAAACGAGCAAAGAAGGGGACAGCTTTGGGCGCAGAGACTTTAACGTTTTTAGACATGAGTTAAGTTC
CTTTTGCAATATTGACCTGCGACCAAGATACTACGGACGAACCGGATATGTCAAGGGAAATCCAGAAAAAATGAT
TAACTTTTA

>549 Typ2

GGAACCTTAACATCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCTGTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCA
GAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTACTCCTTTTATTGGTACTTATAAGTTTTCTTCTGATTTTGAA
GATTTTTTAAGTAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACT
CCCTATTTGATGGCTTGACTTTTTTAACAAAAGTTATCAATTTAAGGTATTTAATATACTTGACAATTTTTGTG
ATTGTGAATAACTATCTATCCTAAATTTCTTAACATATAGCAAGTCTAAATGGATTGTACAAAAAGACTCGCGG
TGATTATTAATCCCCAAAAATATCTATATTCCACTGTAGGGGCGGCATCGCCCTACGATGAATTGGATATCAAAAC
TACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTATATTGGGTGCTGATTCGTGATAAAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAA
GTAAACCACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAATAGA
GCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGGTCTGGACTCTGAAATGGCCTTCCGATTG
GGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCT
ACTCCCGATTTTTGTTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAAATAATGTTTGAGT
CGCTATCAGGAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTGCTG

>553 Typ2

TCCATGGCAGCTGAGAATATTGTAGGAGATCTTCTAGAAAGATCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAAC
CATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCGGTTC
ATCAGTAGTATCTTGGTCGCAGGTTAATATTGCAAAAGGAAGTAACTCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGC
GCCCCAAGCTGTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTGCTCC
TTTCGATACTCGTAAGTTTCTTCCGATTGGGAAGACTCCTGGTAGAGACGTCGCCAGATATAAATAGAGTCGCA
CCTACTACAACCTCGGAAGTATCCTTGCGATTTGGAAGATTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCTACAATTT
AAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCA
AACTACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTATATTGGGTGCTGATTCGTGATATAATCCCAACAATTAGCTTTCTGA
AAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAAT
AGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGGTCTGGACTCTGAAATGGCCTTCCGA
TTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAA
GCTACTCCCGATTTTTGTTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAAATAATGTTTG
AGTCGCTATCAGGAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTGCTGAAAACTCGA

>557 Typ2

ATCTTCTAGAAAGATCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTA
ATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCGGTTCATCAGTAGTATCTTGGTCGCAGGTAAAT
ATTGCAAAAGGAAGCTTAACATCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCTGTCCCCTTCTTTGCTCGT
TTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTGCTCCTTTTCGATACTCGTAAGTTTCTCTCCGAT
TGGAAGACTCCTGGTAGAGACGTGCGCCAGATATAAATAGAGTCGCACCTACTACAACCTCGGAAGTATCCTTGCG
ATTTGGAAGATTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCTACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAA
AAGCTACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTACTTATACAATTGATTTAGACTTG
CTATATTGGGTCGATTTCGTGATATAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATC
AAGGTATCGACCGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAATAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCT
ACTTCTACCGATATCCCCACGGTCTGGACTCTGAAATGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGC
CATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCTACTCCCGATTTTTTGTTTAAATATTA
AGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTAT
TATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTGCTGAAA

>757 Typ1

AGTTTCAGCAGATCGATCGCTGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATCTTAGTAATTAAGGATACTTT
CTTAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACTTATCCTGTTCTGTCGTCGTCAGTATCTCGATCACAGGT
CAATATTACAAAAGTAACTTAACCTTTAGACTTGCTATATCGGGTTGATTTCGTGATACAATCCAGCAATTAGCTT
TCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATTAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTC
TTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGGTCTACTTCTACCGATTTCCCCACGGCCTGGACTTTGAAGTGGCCT
TCCGATTTTGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAAC
TGAAAGCTACTCCCGATTTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAAATAAT
GTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTTCTAGAAGATCTCCTAC
AATATTCTCAGCTGCCATGGAT

>759 Typ1

CTCGAGTTTTTTCAGCAGATCGATCGCTGAAATTCTGCTTACTCCTAGAAAACCAGAAACCATCTTAGTGATTTCAGG
ATACTTTTTTTAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCC
CAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTT
CTTTGCTCGTTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGAC
TTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCA
GTTATTCAATAACTAAAACTACTCCCTATTTTTGTTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCA
GGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTTCTA
GAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCT
GTATATTAAACTTATATTAAGAATATGCTAACCACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTG
GCAATCGACTCTCATGAAAACCTACGAGCTAAATATTCAATATGTTTCTTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTT
TTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTATTAATAAAATTTAAATTTTGAAGAAAGTT
CAGGGTTAATAGCATCCATTTTTTGTCTTGCAAGTTCCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCTCTTTTGACATGT
TTAAAGTTTAAACCTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACATTATACGAGCCGGAAGCATAAAG
TGTAAGCCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATT

>760 Typ1

TTCAGCAGATCTCCCGAATTCATGCCAATAATAACTACCTTTTTTCTGATAGCGACTCAAACATTATTTTCTCC
CTGGTATCACAAATATAAACTACTTTAACTTAATATTTAAACAAAAATAGGGAGTAGTTTTTAGTTATTGAATAA
CTGCTACTCCCTTAATTTTTCGATCAAGATGGCTCTGGTCTACTTAACATCTTCCCAATCGGAAGGCCACTTCAA
AGTCCAGATCGTGGGATATCGGTAGAAGTAGAATCACCAGTTTCTGTGTCTTGCTCTGACAAGAAACGAGCAAA
GAAGGGGACTGCTGATCCGGTCGATACTTTGATATTTTTAGACATAGTAGTTTACTTTTTCAGAAAGCTAATTGTT
GGGATTCTATCACGAATCAATCAGGATATGTCAAGGGAAATCCAGAACAATGATTAACCTTTTATTAAAAAAGTA
TCCTGAATCACTAAGATGGTTTTCTGGTTTTCTAGGAGTAAGCAGAATTTTCAGCGATCGATCTTTCTAGAAGATCTC
CTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAATTCAC

>761 Typ1

CAGCAAGATCGATCGCTGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAG
TTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGA
AAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTC
AGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGA
TTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCATAACTAAAA
GCTACTCCCGATTTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTG
AGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATAT
TCTCAGCTGCCATGGA

>762 Typ1

AGCAGATCATCGCTGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTA
ATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAA
GTAAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGA
GCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTG
GGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAAGCT
ACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGT
TGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCT
CAGCTGCCATGGATCA

>763 Typ1

GCAAGATCAGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATCTTAGTAATTAAGGATACTTTCTTA
ATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACTTATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTCGATCACAGGTCAAT
ATTACAAAAGTAACTTAACTTTAGACTTGCTATATCGGGTTGATTTCGTGATACAATCCCAGCAATTAGCTTTCTG
AAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATTAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGT
CAGAGCAAGACACAGAACTGGTGGTCCTACTTCTACCGATTTCCCCACGGCCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCG
ATTTTGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAA
AGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAAATAATGTTT
GAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAGATCTCCTACAATA
TTCTCAGCTGCCATGGAAAC

>764 Typ1

AGCAGATCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATCTTAGTAATTAAGGATACTTTCTTAA
TAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACTTATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTCGATCACAGGTCAATA
TTACAAAAGTAACTTAACTTTAGACTTGCTATATCGGGTTGATTTCGTGATACAATCCCAGCAATTAGCTTTCTGA
AAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATTAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTC
AGAGCAAGACACAGAACTGGTGGTCCTACTTCTACCGATTTCCCCACGGCCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGA
TTTTGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAA
GCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAAATAATGTTTG
AGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAGATCTCCTACAATAT
TCTCAGCTGCCATGGAACAA

>766 Typ1

CACTCGAGTTTTTCAGCAGATCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATCTTAGTAATTAAG
GATACTTTCTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACTTATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTCGA
TCACAGGTCAATATTACAAAAGTAACTTAACTTTAGACTTGCTATATCGGGTTGATTTCGTGATACAATCCCAGCA
ATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATTAGCAGTCCCCTTCTTTG
CTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGGTCCTACTTCTACCGATTTCCCCACGGCCTGGACTTTGA
AGTGGCCTTCCGATTTTGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTAT
TTAATAACTGAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAG
AAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAGA
TCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAATCA

>775 Typ1

GCTCGAGTTTTTCAGCAGATCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTT
TTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAA
TTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTG
TCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAA
GTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATT
CAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGA
AAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAGAT
CTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATAT
TAAAACCTTATATTAAGAACTATGCTAACCACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGGAATC
GACTCTCATGAAAACCTACGAGCTAAATATTCAATATGTTTCTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTTTTGAAC
GAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTATTAATAAATTTAAATTTTGAAGAAAGTTCAGGGT
TAATAGCATCCATTTTTTGTCTTTGCAAGTTCCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCTCTTTTGACATGTTTAAAG
TTTAAACCTCCTGTGTGAAATTGTTATCCG

>777 Typ1

CTTTTCAGCAGATCGATCGCTGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAAATAA
AAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTC
TGAAAAGTAAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTTCTT
GTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTC
CGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTA
AAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGT
TTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAGATCTCCTACAA
TATTCTCAGCTGCCATGGAACT

>779 Typ1

CTCGAGTTTTTCAGCAAGATCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTT
TTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAA
TTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGC
TCGTTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAA
GTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATT
CAATACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGA
AAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAGAT
CTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATAT
TAAAACCTTATATTAAGAATATGCTAACCACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGCAATC
GACTCTCATGAAAACCTACGAGCTAAATATTCAATATGTTTCTTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTTTTTGAAC
GAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTATTAATAAATTTAAATTTTGAAGAAAAGTTCAGGGT
TAATAGCATCCATTTTTTGCTTTGCAAGTTCCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCTCTTTTGACATGTTTAAAG
TTTAAACCTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAG
GCCTGGGGTGCCTAATG

>788 Typ1

CGCTGAATTCGCTTACTCCTAGAAACCAGAAACCATCTTAGTGATTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATC
ATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTCTGAAAAGTA
AACTACTATGTCTAAAAATATCAAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTTCTTGTCAGAGCA
AGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAAGTGGCCTTCCGATTGGGA
AGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACT
CCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTTGC
TATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAG
CTGCCATGGAAAAGAAAA

>805 Typ1

GATGGCTCGAGTTTTTTCAGCAGATCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGAT
ACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCA
ACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCT
TTGCTCGTTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTT
TGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGT
TATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAG
GAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGA
AGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGT
ATATTAAAACCTTATATTAAGAATATGCTAACCACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGCC
AATCGACTCTCATGAAAACCTACGAGCTAAATATTCAATATGTTTCTTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTTT
GAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTATTAATAAATTTAAATTTTGAAGAAAAGTTCA
GGGTTAATAGCATCCATTTTTTGCTTTGCAAGTTCCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCTCTTTTGACATGTTT
AAAGTTTAAACCTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG
TAAAGC

>836 Typ1

TCAGCAAGATCTCCCGAATTCATGCCAATAATAACTACCTTTTTTCTGATAGCGACTCAAACATTATTTTCTCC
CTGGTATCACAAATATAAACTACTTTAACTTAATATTTAAACAAAAATAGGGAGTAGCTTTTAGTTATTGAATAA
CTGCTACTCCCTTAATTTTCGATCAAGATGGCTCTGGTCTACTTAACTATCTTCCCAATCGGAAGGCCACTTCAA
AGTCCAGATCGTGGGGATATCGGTAGAAGTAGAATCACCAGTTTCTGTGTCTTGCTCTGACAAGAAACGAGCAAA
GAAGGGGACTGCTGATCCGGTCGATACTTTGATATTTTGTAGACATAGTAGTTTACTTTTCAGAAAAGCTAATTGTT
GGGATTCTATCACGAATCAATCAGGATATGTCAAGGGAAATCCAGAACAAATGATTAACTTTTATTAATAAAGTA
TCCTGAATCACTAAGATGGTTTCTGGTTTCTAGGAGTAAGCAGAATTCAGCGATCATCTTCTAGAAGATCTCC
TACAATATTCTCAGCTGCCATGGATC

>839 Typ1

TCGCTGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTGT
TCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTAC
TATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACAC
AGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAG
TTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGAT
TTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAG
GAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCA
TGGATAA

>865 Typ1

GTTTCAGCAAGATCGATCGCTGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATCTTAGTAATTAAGGATACTTT
CTTAATAAAAGTTAATCATTGTCTGGATTTCCCTTGACTTATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTCGATCACAGGT
CAATATTACAAAAGTAACTTAACTTTAGACTTGCTATATCGGGTTGATTTCGTGATACAATCCCAGCAATTAGCTT
TCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATTAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTC
TTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGGTCCTACTTCTACCGATTTCCCCACGGCCTGGACTTTGAAGTGGCCT
TCCGATTTTGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAAC
TGAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAAATAAT
GTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAGATCTCCTAC
AATATTCTCAGCTGCCATGGATC

>873 Typ1

CAGCAGATCGATCGCTGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATCTTAGTAATTAAGGATACTTTCTTAA
TAAAAGTTAATCATTGTCTGGATTTCCCTTGACTTATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTCGATCACAGGTCAATA
TTACAAAAGTAACTTAACTTTAGACTTGCTATATCGGGTTGATTTCGTGATACAATCCCAGCAATTAGCTTTCTGA
AAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATTAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTC
AGAGCAAGACACAGAACTGGTGGTCCTACTTCTACCGATTTCCCCACGGCCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGA
TTTTGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAA
GCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAAATAATGTTTG
AGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAGATCTCCTACAATAT
TCTCAGCTGCCATAG

>1459/16 Typ1

TCAGCAGATCGATCGCTGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAG
TTAATCATTGTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGA
AAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTC
AGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGA
TTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAA
GCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTG
AGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAGATCTCCTACAATAT
TCTCAGCTGCCATGGATC

>7821 Typ1

TTCAGCAGATCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAA
AGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCT
GAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTG
TCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCC
GATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAA
AAGCTACTCCCTATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTT
TGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAAGATCTCCTACAAT
ATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATATTAACCTTAT
ATTAAGAAGTATGCTAACCACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGCAATCGACTCTCATG
AAAAGTACGAGCTAAATATTCAATATGTTTCTTGTGACCAACTTATTCTGCATTTTTTTGAACGAGGTTTAGA
GCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTATTAATAAATTTAAATTTTGAAGAAAGTTTCAGGGTTAATAGCATC
CATTTTTTGCTTTGCAAGTTCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCTCTTTTGACATGTTTAAAGTTTAAACCTC
CTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTG
CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAA

>A7 Typ1

TTCAGCAGATCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAA
AGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCT
GAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTG
TCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCC
GATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAA
AAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTT
TGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAAGATCTCCTACAAT
ATTCTCAGCTGCCATGGAACAAG

>257 Typ1

TTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCTGTGATA
GAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGT
CCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTGAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGAT
CTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGA
GTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTG
ATACCAGGAAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAAGGC

>260 Typ1

TTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCTGTGATA
GAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGT
CCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTGAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGAT
CTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGA
GTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTG
ATACCAGGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTTTCGGGGAGA

>390 Typ2

TTTTATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCGGTTCATCAGTAGTATCTTGGTTCGCAGGT
TAATATTGCAAAAGGAAGTTAACTCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCTGTCCCCTTCTTTGC
TCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTGCTCCTTTCGATACTCGTAAGTTTCCCTC
CGATTGGGAAGACTCCTGGTAGAGACGTCGCCAGATATAAATAGAGTCGCACCTACTACAACCTCGGAAGTATCCT
TGCGATTTGGAAGATTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCTACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAA
CTAAAAGCTACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTACTTATACAATTGATTTAGA
CTTGCTATATTGGGTGATTTCGTGATATAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAA
TATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAATAGAGCAAGACACAGAACTGGTGA
TTCTACTTCTACCGATATCCCCACGGTCTGGACTCTGAAATGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCA
GAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAAT
ATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAG
TTATTATTGGCTG

>396 Typ2

AAGTTTAAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCGGTTCATCAGTAGTATCTTGGTTCGCAGGTTAATATT
GCAAAAGGAACCTTAACATCATGTCCAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCTGTCCCTTCTTTGCTCGTTTC
TTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTGCTCCTTTTCGATACTCGTAAGTTTCCCTTCCGATTGG
GAAGACTCCTGGTAGAGACGTGCGCAGATATAAATAGAGTCGCACCTACTACAACCTCGGAAGTATCCTTGCGATT
TGGAAGATTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCTACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAG
CTACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTA
TATTGGGTCGATTTCGTGATATAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAG
GTATCGACCGGATCAGCAGTCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAATAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACT
TCTACCGATATCCCCACGGTCTGGACTCTGAAATGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCAT
CTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCTACTCCCGATTTTGTTTAAATATTAAGT
TAAAGTAGTTTTATATTGTGAT

>770 Typ1

TACTTTCTTAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACTTATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTCGATC
ACAGGTCAATATTACAAAAGTAACTTAACCTTTAGACTTGCTATATCGGGTTGATTTCGTGATACAATCCAGCAAT
TAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATTAGCAGTCCCTTCTTTGCT
CGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGGTCTACTTCTACCGATTTCCTTCCGATTTCCCGATTTCCCGAT
TGGCCTTCCGATTTTGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTT
AATAACTGAAAGCTACTCCCGATTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTATATTGTGATACCAGGGAGAA
AATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATGCGGGAGAG

>771 Typ1

AAGGATACTTTCTTAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACTTATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCT
CGATCACAGGTCAATATTACAAAAGTAACTTAACCTTTAGACTTGCTATATCGGGTTGATTTCGTGATACAATCCCA
GCAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATTAGCAGTCCCTTCT
TTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGGTCTACTTCTACCGATTTCCTTCCGATTTCCCGAT
TGAAGTGGCCTTCCGATTTTGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGT
TATTTAATAACTGAAAGCTACTCCCGATTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTATATTGTGATACCAG
GAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGACGGCTT

>782 Typ1

TACTTTTTTAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCC
AACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCTTCT
TTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACT
TTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAG
TTATTCAATAACTAAAACTACTCCCTATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTATATTGTGATACCAG
GGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGAAGAAGCT

>787 Typ1

TTTTTTAAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAAC
AATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCTTCTTT
GCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTG
AAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTA
TTCAATAACTAAAACTACTCCCTATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTATATTGTGATACCAGGGA
GAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGAGA

>804 Typ1

AACTTTTTTAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCC
AACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCTTCT
TTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACT
TTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAG
TTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTATATTTTGATACCCA
GGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGG

>807 Typ1

ATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGC
TTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTCGTT
TCTTGTCTAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGCC
CTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATA
ACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATA
ATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGAGGCCGAA

>814 Typ1

CTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAA
CAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCCTTCTT
TGCTCGTTTCTTGTCTAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTT
GAAGTGCCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTT
ATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGG
AGAAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATGCGGG

>815 Typ2

GGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTTTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCGGTTCGTCCGTAGTATCTTG
GTCGCAGGTCAATATTGCAAAAGGAACCTTAACCTCATGTCTAAAAACGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCTGTCCC
CTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAACAAGCCGTGGAAGCTAACAAATTCTAATTCTGCTCCTTACGCTAATACTAT
GAAGTATCCTTCCGATTGGGAAGAACAGTTCTAATTCTACTCCTTTTCATTGGTACTTATAAGTATCCTTCCGATT
TTGAAGATGCTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAG
CTACTCCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATGTCAAACCTACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTA
TATTGGGTCGATTTCGTGATATAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAG
GTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAATAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACT
TCTACCGATATCCCCACGGTCTGGACTCTGAAATGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCAT
CTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGT
TAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTAT

>828 Typ1

TTCAGGATACTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATA
GAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGT
CCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCTAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGAT
CTGGACTTTGAAGTGCCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGA
GTAGCAGTTATTCAATAACTAAAACTACTCCCTATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTG
ATACCAGGGAGAAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCG

>830 Typ1

TAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTA
GCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTCG
TTTCTTGTCTAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTG
GCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAA
TAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAA
TAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGATTTCCGGGAGAGAGCATA

>838 Typ1

TTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAA
TTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCCTTCTTTGC
TCGTTTCTTGTCTAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAA
GTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATT
CAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGA
AAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAGTT

>840 Typ1

TAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTA
GCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTCG
TTTCTTGTCTAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTG
GCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAA
TAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAA
TAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATCCGGGAGAGGCCA

>976 Typ1

AGGATACTTTTTTAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAA
TCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCC
CTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTG
GACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAAATTAAGGGAGTA
GCAGTTATTCAATAACTAAAACTACTCCCTATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATA
CCAGGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGATTGGGGAGAGAGGA

>1459/11A Typ1

TCGATCGCCGGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAGTTAATCA
TTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAA
ACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAA
GACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAA
GATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTC
CCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTGAGTGCTTC
AGAAAAAAAAGA

>169 Typ1

TTCTGGATTTCCCTTGACATATCCCGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTA
CTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACA
CAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATA
GTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGA
TTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCA
GGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATGGGGG

>111 Typ1

TGGATACTTTTTTAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAA
TCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCC
CTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTG
GACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAAATTAAGGGAGTA
GCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATA
CCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGA

>110 Typ1

GATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTTATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGA
TTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTC
TAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAAAC
TGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGT
AGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGT
TTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAA
AGGTAGTTATTATTGGCATGATTTTCGGGGAGA

>108 Typ1

TCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAGTTAATCA
TTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAA
ACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAA
GACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAA
GATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTC
CCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCT
ATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGACG

>Mvd139 Typ1

TCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTTATAAAAGTTAATCA
TTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCTTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAA
ACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAA
GACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAA
GATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTC
CCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCT
ATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGA

>145 Typ1

ATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTTATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGAT
TTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCT
AAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACT
GGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTA
GACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGT
TAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAA
GGTAGTTATTATTGGCATGATTTTCGGGGAGA

>1459.17 Typ1

GGATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTTATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGG
ATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGT
CTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAAA
CTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAG
TAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTG
TTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAA
AAGGTAGTTATTATTGGCATGATTT

>1459.14 Typ1

ATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTTATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGAT
TTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCT
AAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACT
GGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTA
GACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGT
TAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAA
GGTAGTTATTATTGGCTGATTTTTCGGGGGA

>1459.15 Typ2

GGCATGGTCGTTAGTGATTAGGATACTTTTTTTATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCG
GTTTCGTCCGTAGTATCTTGGTCGCAGTTCAATATTGCAAAAGGAACCTTAACCTCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCT
CTGCGCCCAAAGCTGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAATTCTAATTCTG
CTCCTGCTACCACTCGGAAGTATCCTTCCGATTGGGAAGATTATTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAAT
TTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTGAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATAT
CAAATACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTATATTGGGTCGATTCTGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCT
GAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCCGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTG
TCAGAACAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTCAAGTGGCCTTCC
GATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAA
AAGCTACTCCCTATTTTTGTTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAATAATGTT
TGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCTGATTTCTCGGAGAA

>126 Typ2

CGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATTTTAGTGATTTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGT
TAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTTGGTCGCAGGTCAATATTGCAAA
AGGAACCTTAAGTATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGC
AGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAATTCTAATTCTGCTCCTTACGGTAATACTATGAAGTATCCTTCCGATTGGGA
AGAATATTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTAAAAGCTACT
CCCTATTTGATTGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATATCAAATACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTATATTG
GGTCGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAGTATC
GACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAACAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTAC
CGATATCCCCACGATCTGGACTTTCAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCAATCTTGA
TCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTTAAATATTAAGTTAAAG
TAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCA
TGAATTCGGGAG

>1459.21 Typ1

GAATCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGA
TTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTC
TAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAAAC
TGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGT
AGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGT
TTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAA
AGGTAGTTATTATTGGCTGATT

>1459.30 Typ1

TCGATCGCTGGATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTTATAAAAAGTTAATCAT
TTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAA
CTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAG
ACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAG
ATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAAGCTACTCC
CGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTTGCTA
TCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGATTTTCGGGGAGA

>1459.31 Typ1

TCGATCGCCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATC
ATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTA
AACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCA
AGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGA
AGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAAGCTACT
CCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTTGC
TATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTTTCGGGAGA

>1459.36 Typ1

ACCACCGTAACATCTTAGTATTAAGGATACTTTCTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACTT
ATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTCGATCACAGGTCAATATTACAAAAGTAACCTTAACCTTTAGACTTGCTATATCGG
GTTGATTTCGTGATACAATCCAGCAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCG
ACCGGATTAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGGTCCTACTTCTACC
GATTTCCCCACGGCCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTTTGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGAT
CGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGT
AGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCTG

>161 Typ1

TCGATCGCTGGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTTATAAAAAGTTAATCA
TTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAA
ACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAA
GACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGA
GATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAAGCTACTC
CCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTTGCT
ATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTTTCGGGGAGA

>250 Typ1

GATTCTGCTTACTCCTAGAAACCAGAAACCATCTTAGTGATTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTG
TTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTA
CTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACA
CAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATA
GTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAAGCTACTCCCTA
TTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCA
GGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGATTTTCGGGGAGA

>251 Typ1

GATTCTGCTTACTCCTAGAAACCAGAAACCATCTTAGTGATTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTG
TTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTA
CTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACA
CAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATA
GTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAAGCTACTCCCTA
TTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCA
GGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGATGTCTGGGAGACG

>252 Typ1

TTCTGCTTACTCCTAGAAACCAGAAACCATCTTAGTGATTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTT
CTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACT
ATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACA
GAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGT
TAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAAGCTACTCCCTATT
TTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGG
AAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTTTCGGGGAGAGA

>253 Typ1

GATTCTGCTTACTCCTAGAAACCAGAAACCATCTTAGTGATTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTG
TTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAACTA
CTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACA
CAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATA
GTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAACTACTCCCTA
TTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCA
GGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGA

>Mvd254 Typ1

CGTCGATCGCCGGAAATTCTGCTTACTCCTAGAAACCAGAAACCATCTTAGTGATTCAGGATACTTTTTTAATAA
AAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCT
TGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTT
GTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTC
CGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTA
AAACTACTCCCTATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAATAATGT
TTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGA

>255 Typ1

GGATCTGCTTACTCCTAGAAACCAGAAACCATCTTAGTGATTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTG
TTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAACTA
CTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACA
CAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATA
GTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAACTACTCCCTA
TTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCA
GGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGATTTTCGGGAGA

>256 Typ1

GATTCTGCTTACTCCTAGAAACCAGAAACCATCTTAGTGATTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTG
TTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAACTA
CTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACA
CAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATA
GTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAACTACTCCCTA
TTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCA
GGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGATTTTCGGGAGA

>277 Typ1

TCGATCGCCGGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCA
TTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAA
ACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAA
GACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAA
GATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAACTACTC
CCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCT
ATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGA

>274 Typ1

ATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGAT
TTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCT
AAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACT
GGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTA
GACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAACTACTCCCGATTTTTGTT
TAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAA
GGTAGTTATTATTGGCATGATTTTCGGGAGA

>2A Typ2

AAAAC TGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATT TTTAGTGATT CAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTG
TTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTTGGTCGCAGGTCAATATTGCAAAAAGGAACCTAA
CTGATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCC
GTGGAAGCTAACAATTCTAATTCTGCTCCTTACCCTACTACTCTGAAGTATCCTTCCGATTGGGAAGATTATTAA
ATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTGAAAGCTACTCCCTATTTG
ATGGCTTGATTTTTTTTAAACAAAAGTTATTAACAGGACTTACGCACAAGACCAAAGAAACCGGGTTTCTGGCCCTG
ATTTTGCGGATGAAATCCAACTTATCGTTTACAGAAACCCGGTTTCTGCGTAAGTCCTAATTAATTTAACGCCAAT
ATTTATACAATTGATTTAACTTGCTATGTCTGATTGATTCTGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAG
TAAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCCGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCTAGAA
CAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTCAAGTGGCCTTCCGATTGG
GAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCAATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTA
CTCCCGATTTTTGTTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAAATAATGTTGAGTCG
CTATCAGAAAAAAAAGG

>299 Typ1

GATTCTGCTTACTCCTAGAAACCAGAAACCATCTTAGTGATT CAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTG
TTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAACTA
CTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCTAGAGCAAGACA
CAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATA
GTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCTA
TTTTTGTTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTGAGTGCTTCAGAA
AAAAAATG

>307 Typ3

GTCAC TCTACAAACCAGAAACCATT TTAGTGATCAGAATCTTTTATAAAAAGTATCATGTCTGATTTACCTGACAAAT
ATCTGTCTGTCGTAGTATCTGTCTGCAGTCAATATGCAAAAAGACTACTGATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGC
CCAAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAATTCTAATTCTGCTCCTT
TCTCTACTTTATAAGTATCCTTCCGATTTTGAAGATTTTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGG
GAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGACTTTTTTAACAAAAGTTATCAATTT
AAGGTATTTAATATACTTGACAATCCCTGCTGATTGTGAATAACTATCCGTCCTAAATTTCTAGATTATTGGGT
TAAAATTTACTTGACATATCTGGTCACTACTGATAGGATTTTAACAATTAATTTCTGGAAAAGGAACCTTAAC TCA
TGTCTAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCGGAGCAAGCCGTGG
AAGCTAACAATTCTAATTCTGCTCCTTACGGTAATACTATGAAGTATCCTTCCGATTGGGAAGAATATTAAATAG
ATAAGAGCAATCTTAATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATTGC
TTGATTTTTTTTAAAGATTGGATATCAAAC TACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTATATTGGGTGCTGATTTCGTGAT
AGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCCG
TCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCTAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGG
TCTGGACTTTTCAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATTGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGG
AGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGT
GATCCCCAGGAGAAAAATAATGTTGAGTCGCTATCAGAAAAAAAAGG

>31.1 Typ2

AAAATCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATCTTAGTGATT AAGAATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTT
GTGTTGGATTTCCCTTGACATATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTTGGTCGCAGGTCAATATTGCAAAAAGGAACCTA
ACTCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCTGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGC
CGTGAAGCTAACAATTCTAATTCTGCTCCTGGTACCCTCGGAAGTATCCTTCCGATTGGGAAGAGTGGTAGAG
ACATCGCCCGCCAGATATAAATAAAGTCGCACCTACTACCAATCGGAAGTATCCTGGCGATTGGGAAGATTTTTA
AATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTT
GATTGCTTGATTTTTTTTAAAGATTGGATATCAAAC TACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTATATTGGGTGCTGATT
CGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGAT
CAGCCGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCTAGAACACAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCC
CCACGATCTGGACTTTTCAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAAT
TAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTA
TATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTTG
GGGAGAA

>3 Typ1

TCGATCGCCGGATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCAT
TTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAA
CTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAG
ACACAGAAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAG
ATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAAGCTACTCC
CGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTTGCTA
TCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGATTTCCCGGGAGA

>320 Typ1

GGATCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGA
TTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAACTACTATGTC
TAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAAAC
TGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGT
AGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAACTACTCCCTATTTTTGT
TTAAATACTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAAATAATGTTGAGTCGCTTCAGAAAAAAG
GG

>40 Typ1

TCGATCGCCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATCTTAGTAATTAAGGATACTTTCTTAATAAAA
GTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACTTATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTCGATCACAGGTCAATATTACA
AAAGTAACTTAACTTTAGACTTGCTATATCGGGTTGATTTCGTGATACAATCCCAGCAATTAGCTTTCTGAAAAGT
AAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATTAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGC
AAGACACAGAACTGGTGGTCCTACTTCTACCGATTTCCCCACGGCCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTTTTG
AAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCTAC
TCCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTCG
CTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTTTCGGGGAGA

>32 Typ2

ACTCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATTTTTAGTGATTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCT
GGATTTCCCTTGACATATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTTGGTCGCAGGTCAATATTGCAAAAAGGAACCTAACTCA
TGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGG
AAGCTAACAATTCTAATTCTGCTCCTTACCCTACTACTCTGAAGTATCCTTCCGATTGGGAAGATTATTAAATAG
ATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTGAAAGCTACTCCCTATTTGATGG
CTTGATTTTTTTTAAACAAAAGTTATTAACAGGACTTACGCACAAGACCAAAGAAACCGGGTTTCTGGCCCTGATTT
TGCGGATGAAATCCAACTTATCGTTCAGAAACCCGGTTTCTGCGTAAGTCCTAATTAATTTAACGCCAATATTT
ATACAATTGATTTAACTTGCTATGTCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAA
CTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCCGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAACAAAG
ACACAGAAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTCAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAG
ATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCC
CTATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAAATAATGTTTGAGTCGCTA
TCAGGAAAAAAGGTAGTTATTTTGCTGAAGTATTCTCCCGAGAAA

>39 Typ1

GATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGA
TTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAACTACTATGTC
TAAAAATATCAAGGTGTCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAAAC
TGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGT
AGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGT
TTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAA
AGGAAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGGAGA

>41 Typ2

AGAACTCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATTTTAGTGATTTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGT
TCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTTGGTCGCAGGTCAATATTGCAAAAAGGAACCTAAC
TGATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCCAAAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCG
TGGAAGCTAACAATTCTAATTCTGCTCCTTACCCTACTACTCTGAAGTATCCTTCCGATTGGGAAGATTATTTAA
TAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTGAAAGCTACTCCCTATTTGA
TGGCTTGATTTTTTTAACAAAAGTTATTAACAGGACTTACGCACAAGACCAAAGAAACCGGGTTTCTGGCCCTGA
TTTTGCGGATGAAATCCAAACTTATCGTTTCAGAAACCCGGTTTCTGCGTAAGTCCTAATTAATTTAACGCCAATA
TTTATACAATTGATTTAAACTTGCTATGTCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGT
AACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCCGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTGAGAAC
AAGACACAGAAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTCAAGTGGCCTTCCGATTGGG
AAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCAATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAAGCTAC
TCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAAATAATGTTGAGTCG
TATCAGAAAAAAGTT

>63 Typ2

AAAATCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATTTTAGTGATTTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTT
GTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTTGGTCGCAGGTCAATATTGCAAAAAGGAACCTA
ACTGATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCCAAAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGC
CGTGGAAGCTAACAATTCTAATTCTGCTCCTTACCCTACTACTCTGAAGTATCCTTCCGATTGGGAAGATTATTA
AATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTGAAAGCTACTCCCTATTT
GATGGCTTGATTTTTTTAACAAAAGTTATTAACAGGACTTACGCACAAGACCAAAGAAACCGGGTTTCTGGCCCT
GATTTTTCGCGATGAAATCCAAACTTATCGTTTCAGAAACCCGGTTTCTGCGTAAGTCCTAATTAATTTAACGCCAA
TATTTATACAATTGATTTAAACTTGCTATGTCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAA
GTAAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCCGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTGAGAAC
ACAAGACACAGAAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTCAAGTGGCCTTCCGATTG
GGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCAATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAAGCT
ACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAAATAATGTTGAGTC
GCTTCAGAAAAAAGGT

>5-81 Typ2

TTCGATCGCCTGGAAATCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATTTTAGTGATTTCAGGATACTTTTTTAATAAAA
AGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTTGGTCGCAGGTCAATATTGC
AAAAGGAACTTAAGTATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCCAAAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTT
AGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAATTCTAATTCTGCTCCTTACCCTACTACTCTGAAGTATCCTTCCGATTG
GGAAGATTATTAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAAATAACTGAAAGC
TACTCCCTATTTGATGGCTTGATTTTTTTAACAAAAGTTATTAACAGGACTTACGCACAAGACCAAAGAAACCGG
GTTTCTGGCCCTGATTTTTCGCGATGAAATCCAAACTTATCGTTTCAGAAACCCGGTTTCTGCGTAAGTCCTAATTA
ATTTAACGCCAATATTTATACAATTGATTTAAACTTGCTATGTCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTA
GCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCCGTCCCCCTTCTTTGCTCG
TTTCTTGTGAGAACAGACACAGAAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCCGATCTGGACTTTCAAGTG
GCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCAATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAA
TAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGTCCCCAGGAGAAAAAT
AATGTTGAGTCGCTTCAGAAAAAAGAGT

>64 Typ1

TCGATCGGCCGGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATCTTAGTAATTAAGGATACTTTCTTAATAAAA
GTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACTTATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTCGATCACAGGTCAATATTACA
AAAGTAACTTAACCTTTAGACTTGCTATATCGGGTTGATTTCGTGATACAATCCCAGCAATTAGCTTTCTGAAAAGT
AACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATTAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTGAGAGC
AAGACACAGAAACTGGTGGTCTACTTCTACCGATTTCCCCACGGCCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTTTG
AAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCTAC
TCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAAATAATGTTGAGTCG
CTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCCGGGAGA

>66 Typ2

ACTCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATTTTAGTGATTTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCT
GGATTTCCCTTGACATATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTTGGTCGCAGGTCAATATTGCAAAAAGGAACCTTAAC
TGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGG
AAGCTAACAATTCTAATTCTGCTCCTTACCCTACTCTGAAGTATCCTTCCGATTGGGAAGATTATTAATAG
ATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGCAGTTATTAATAAAGTAAAGCTACTCCCTATTTGATGG
CTTGATTTTTTTTAAACAAAAGTTATTAACAGGACTTACGCACAAGACCAAGAAACCGGGTTTCTGGCCCTGATTT
TGCGGATGAAATCCAACTTATCGTTCAGAAACCCGGTTTCTGCGTAAGTCCTAATTAATTTAACGCCAATATTT
ATACAATTGATTTAACTTGCTATGTCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAA
CTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCCGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTGTCAGAACAG
ACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTCAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAG
ATAGTTAAGTAGACCAGAGCAATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCC
CGATTTTTGTTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATCCCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTCGCTA
TCAGGAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAAAATTCCGGGAAGA

>79 Typ1

GATTCTGCTCACTCCTACAAACCAAAAACCATCTTAGTGATTTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTTG
TTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTA
CTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTGTCAGAGCAAGACA
CAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATA
GTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCTA
TTTTTGTTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCA
GGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGATTTCCGGGAGA

>80 Typ1

GGATTCTGCTTACTCCTAGAAACCAGAAACCATCTTAGTGATTTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTT
GTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACT
ACTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTGTCAGAGCAAGAC
ACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGAT
AGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCT
ATTTTTGTTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAAATAATGTTTGAGTCGCTATC
AGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGATTTTCGGGAGAAG

>82 Typ1

ATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTTATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGAT
TTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCT
AAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTGTCAGAGCAAGACACAGAACT
GGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTA
GACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTT
TAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAA
GGTAGTTATTATTGGCATG

>7811 Typ1

GGATTCTGCTCACTCCTACAAACCAAAAACCATCTTAGTGATTTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTT
GTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACT
ACTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTGTCAGAGCAAGAC
ACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGAT
AGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCG
ATTTTTGTTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAAATAATGTTTGAGTTGCTATC
AGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTTTCGGGAGA

>Mvd7805 Typ1

GGATTCTGCTTACTCCTAGAAACCAGAAACCATCTTAGTGATTTCAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCATTT
GTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACT
ACTATGTCTAAAAATATCAAAGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTGTCAGAGCAAGAC
ACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGAT
AGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCT
ATTTTTGTTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAGAAAAATAATGTTTGAGTCGCTATC
AGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGATTTTCGGGAGA

>91.1 Typ1

TCGATCGGCTGGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATC
ATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTA
AACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCA
AGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGA
AGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACT
CCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGC
TATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGATTTTCGGGAGA

>97 Typ1

TCGATCGCCGGATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAAGTTAATCAT
TTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTTCGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAA
CTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAG
ACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAG
ATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCC
CGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTA
TCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTTTCGGGAGA

>769 Typ1

CTCGAGTTTTTTCAGCAAGATCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATCTTAGTAATTAAG
GATACTTTCTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACTTATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCTCGA
TCACAGGTCAATATTACAAAAGTAACCTTAACCTTTAGACTTGCTATATCGGGTTGATTTCGTGATACAATCCAGCA
ATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATTAGCAGTCCCCCTTCTTTG
CTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGGTCTACTTCTACCGATTTCCCCACGGCCTGGACTTTGA
AGTGGCCTTCCGATTTTGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGTTAT
TTAATAACTGAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGGGAG
AAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGAAGA
TCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATA
TTAAACTTATATTAAGAAGTATGCTAACCACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGGAAT
CGACTCTCATGAAAACACGAGCTAAATATTCAATATGTTCTCTTGACCAACTTTATTTCTGCATTTTTTTTGAA
CGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGAACTGAGACAGGAATTTTATTAATAAATTTAAATTTTGAAGAAAAGTTCAGGGT
TAATAGCATCCATTTTTTGTCTTTGCAAGTTCCTCAGCATTCTTAACAAAGACGTCTCTTTTGACATGTTTAAAGT
TTAAACCTCCTGTGTGAAATGT

>772 Typ1

TGGCTCGAGTTTTTTCAGCAAGATCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATCTTAGTAATT
AAGGATACTTTCTTAATAAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACTTATCCTGTTTCGTCCGTAGTATCT
CGATCACAGGTCAATATTACAAAAGTAACCTTAACCTTTAGACTTGCTATATCGGGTTGATTTCGTGATACAATCCCA
GCAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATTAGCAGTCCCCCTTCT
TTGCTCGTTTCTTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGGTCTACTTCTACCGATTTCCCCACGGCCTGGACTT
TGAAGTGGCCTTCCGATTTTGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAATTAAGGGAGTAGTAGT
TATTTAATAACTGAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTGTGATACCAGG
GAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTCTAGA
AGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGT
ATATTAAACTTATATTAAGAAGTATGCTAACCACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGGC
AATCGACTCTCATGAAAACACGAGCTAAATATTCAATATGTTCTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTTTT
GAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTATTAATAAATTTAAATTTTGAAGAAAAGTTC
GGGTTAATAGCATCCATTTTTTGTCTTTGCAAGTTCCTCAGCATTCTTAACAAAGACGTCTCTTTTGACATGTTT
AAAGTTTAAACCTCCTGTGTGAATTGTAT

>776 Typ1

AGATGGCTCGAGTTTTTTCAGCAAGATCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAGTGATTAAGG
ATACTTTTTTAAATAAAAGTTAATCATTTTGTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGATTGATTCGTGATAGAATCC
CAACAATTAGCTTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCCCCCTT
CTTTGCTCGTTTTCTGTGTCAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCTGGAC
TTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAAATTAAGGGAGTAGCA
GTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTTTGATACCC
AGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTTTCTA
GAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCT
GTATATTAATACTTATATTAAGAAGTATGCTAACCACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTG
GCAATCGACTCTCATGAAAACCTACGAGCTAAATATTCAATATGTTCTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTT
TTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTATTAATAAATTTAAATTTTGAAGAAAGTT
CAGGGTTAATAGCATCCATTTTTTGTCTTGCAAGTTCCTCAGCATTTCTTAACAAAAGACGTCTCTTTTGACATGT
TTAAAGTTTAAACCTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACATTATACGAGCCGGAAGCATAAGT
GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATT

>806 Typ2

GATCTTCTAGAAAGATCTCCCGAATTCATGCCAATAATAACTACCTTTTTTCTGATAGCAACTCAAACATTATT
TTCTCCTGGGTATCAAATATAAACTACTTTAACTTAATATTTAAACAAAAATTAGGAGTAGCTTTTAGTTATT
GGCTACTCCCTTAATTTTCGATCAAGATGGCTCTACTTAACTATCTTCCCAATCGGAAGGCCACTTCCAAGTCCA
GACCGGGGCGGGGATATCGGTAGAAGTAGAATCACCAGTTTCTGTGTCTTGCTCTGTTAAGAAACGAGCAAGAA
GGGGACGGCTAAGTCGGTCGATACTTTGATATTTTTAGACATAGTAGTTTACTTTTTCAGAAAAGCTAATTGCTGGG
ATTGTATCACGAATCGACCAGATATGGCAAGACTTACCTAAAGACCTACCGCCCTATTCCACCGTTTAAAGTAGGT
GGTCATAATTAAAGTTAAATACTAAAAGCTGTAAGTTCTTCAGGATAATGATTTTCAGCTTTCCGTTTGTGACG
TTATTTATGCCCACCTACTTATAAAAAAATTGATGATTGATGAAATTGTGGTAAACGCATTTTAAATCCCCACAC
AATTTACGGGAATTGTTACCGTTGAACTGCTGACCTGATAGACGATACCAAGCTACTACTAACTGGAGTAAAC
GACAACGCCATCTAATCAAAATATGCCAGATCAAAAAGATGCCGAATTTATACATGATTTGTGGTGCAAATGGGTC
AGGAAACCAACCGCGCTTTACAAATTCTCCCCAACTTCCCTAGAAGTATTTCAATATGTAATGCCGATGAAAT
TGCTGCGGGACTTTCTCCCTTTAATTCTGAATCCGTAGCGATTCAAGCCGGACGATTAATGTTAGAAAGATTAGA
AACTTTAGTTAATAATCGAGTTGATTTTGTCTTTTGAACCTACTTTAGCAACTCGCAGTTATGCCCGTTTTTTGAG
AACTGTAAAAATAAAGCTTATCAAATAAACTTAATTTATTTTTGGTTACAAAGCCCGGAATTAGCAATCGCAAG
AGTACGCAGACGGGTAGAAAGCGGGGGTCACAATATCCAGAAGATGTCATTGCGCCCGTTATGAACGGGGACG
GAAAAACCTGACTGATTTGTATTTATGTTTATGCGATACTTGATAGTCTACGATAATTCTGGGACTAGCCCTCA
ATTAGTAGCCACATTAGGAAATAACCAAGAGGTAATAATTTATGAACCCGCCACCTGGAATCAAATCACCTCCG
AGAATAACCTCCAAATTCCCCTAACAGAACTTCATCAAAAAATTGATGCTGGGGTTAAAGTTGCTATTGCTAAAG
CCCTAGATAAACATCGGAAATTAGGGGAATCTATCAGTGTTTGGCAAGATGGAAAAGTTATCACGTTAAATGCAG
AGGAAATTCCTCAGCCTCCATCAAATTAATTAATACTTTTTATTAATAAAGTCAAGCCATCAAATAGGGAGTAG
CTTTTAGTTATTAATAAATGCTACTCCCTTAAATTGTAGATTAAGATTGCTCTTATCTATTTAAAAATCTTCCA
AATCGCAAGGATACTTCCGAGTTGTAGTAGGTGCGACTCTATTTATATCTGGCGACGTCTCTACCAGTCTTCCCA
ATCGGAAGGAACTTACGAGTATCGAAAGGAGCAGAATTAGAAGTGTAGCTTCCACGGCTTGCTCTGCTAAGAA
ACGAGCAAAGAAGGGGACAGCTTTGGGCGCAGAGACTTTAACGTTTTTAGACATGAGTTAAGTTCTTTTGAAT
ATTGACCTGCGACCAAGATACTACGGACGAACCGGATATGTCAAGGGAAATCCAGAAAAAATGATTAACTTTTAT
TAAAAAGTATCCTTAATCACTAAGATGGTTTGTAGGAGTGAGCAGAATTCAGCGATCGATCTGCT

>21- Typ1

TAGAAAGATCTCCCGAATTCATGCCAATAATAACTACCTTTTTTCTGATAGCAACTCAAACATTATTTTCTCCT
GGGTATCAAATATAAACTACTTTAACTTAATATTTAAACAAAAATCGGGAGTAGCTTTTAGTTATTGAATAAC
TGCTACTCCCTTAATTTTCGATCAAGATGGCTCTGGTCTACTTAACTATCTTCCCAATCGGAAGGCCACTTCAAA
GTCCAGATCGTGGGGATATCGGTAGAAGTAGAATCACCAGTTTCTGTGTCTTGCTCTGACAAGAAACGAGCAAG
AAGGGGACTGCTGATCCGGTCGATACCTTGATATTTTTAGACATAGTAGTTTACTTTTTCAGAAAAGCTAATTGTTG
GGATTCTATCACGAATCAATCAGGATATGTCAAGGGAAATCCAGAACAAATGATTAACCTTTTATTAATAAAGTAT
CCTTAATCACTAAGATGGTTTGTAGGAGTGAGCAGAATTCAGCGATCGATCTTGCTGAAAACTCGAGCCATCC
GGAAGATCTGGCGGCCGCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCCGATGGATATGGTGTTCAAGGCACAAGTGTT
AAAGCAGTTGATTTTATTTACTATGATGAAAAAACAATGAATGGAACCTGCTCCAAGTTAAAAATAGAGATAAT
ACCGAAAACCTCATCGAGTAGTAAGATTAGAGATAATACAACAATAAAAAAATGGTTTGAAGTACTCACAGCGT
GATGCTACTAATTGGGACAATTTTCCAGATGAAGTATCATCTAAGAATTTAAATGAAGAAGACTTCAGAGCTTTT
GTTAAAAATTATTTGGCAAAAAATAATATAATTCGGCTGCAGGGGCGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTT
AATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGACC

>778 Typ1

TAGAAGATCTCCCGAATTCATGCCAATAATAACTACCTTTTTTCTGATAGCAACTCAAACATTATTTTCTCCTG
GGTATCAAAATATAAACTACTTTAACTTAATATTTAAACAAAATCGGGAGTAGCTTTTAGTTATTGAATAACT
GCTACTCCCTTAATTTTCGATCAAGATGGCTCTGGTCTACTTAACTATCTTCCCAATCGGAAGGCCACTTCAAAG
TCCAGATCGTGGGGATATCGGTAGAAGTAGAATCACCAGTTTCTGTGTCTTGCTCTGACAAGAAACGAGCAAAGA
AGGGGACTGCTGATCCGGTCGATACCTTGATATTTTAGACATAGTAGTTTACTTTTCAGAAAGCTAATTGTTGG
GATTCTATCACGAATCAATCAGGATATGTCAAGGGAAATCCAGAACAAATGATTAACCTTTATTAAGAAAGTATC
CTTAATCACTAAGATGGTTTGTAGGAGTGAGCAGAATTTACGCGATCGATCTTGCTGAAAACTCGAGCCATCCG
GAAGATCTGGCGGCCGCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCCGGATGGATATGGTGTTCAGGCACAAGTGTTA
AAGCAGTTGATTTTATTCATCATGATGAAAAAACAATGAATGGAACCTGCTCCAAGTTAAAAATAGAGATAATA
CCGAAAACCTCATCGAGTAGTAAGATTAGAGATAATACAACAATAAAAAAATGGTTTAGAACTTACTCACAGCGTG
ATGCTACTAATTGGGACAATTTTCCAGATGAAGTATCATCTAAGAATTTAAATGAAGAAGACTTCAGAGCTTTTG
TTAAAAATTATTTGGCAAAAATAATATAATTCGGCTGCAGGGGCGGCTCGTGATACGCCCTATTTTATAGGTTA
ATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCG
GAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAATAT

>781 Typ2

CGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATCGATCGCTGAAATCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATTTTAGTGAT
TTCAGGATACTTTTTTAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGTTTCGTCCGTAGTAT
CTTGGTCGCAGGTCAATATTGCAAAGGAACCTTAAGTATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCAG
TCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAATTCTAATTCTGCTCCTTACCCTACTA
CTCTGAAGTATCCTTCCGATTGGGAAGATTATTAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAG
CAGTTATTAATAACTGAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGATTTTTTAAACAAAAGTTATTAACAGGACTTA
CGCACAAGACCAAAGAAACCGGGTTTCTGGCCCTGATTTTGCAGGATGAAATCCAAACTTATCGTTTCAGAAACCCG
GTTTCTGCGTAAGTCCTAATTAATTTAACGCCAATATTTATACAATTGATTTAACTTGCTATGTCTGATTGATT
CGTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGAT
CAGCCGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAACAAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCC
CCACGATCTGGACTTTCAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGTAGTTAAGTAGACCAGAGCAATCTTGATCGAAAAAT
TAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTGTGTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTAT
TATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCG
GGAGATCATCTA

>829 Typ2

GGAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGAGACTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGG
TCGACTCTAGAGGATCTTGTAGACCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATTTTAGTGAT
TCAGGATACTTTTTTAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGTTTCGTCCGTAGTATC
TTGGTCGCAGGTCAATATTGCAAAGGAACCTTAAGTATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCAGT
CCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAATTCTAATTCTGCTCCTTACCCTACTAC
TCTGAAGTATCCTTCCGATTGGGAAGATTATTAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAGTAGC
AGTTATTAATAACTGAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGATTTTTTAAACAAAAGTTATTAACAGGACTTAC
GCACAAGACCAAAGAAACCGGGTTTCTGGCCCTGATTTTGCAGGATGAAATCCAAACTTATCGTTTCAGAAACCCGG
TTTCTGCGTAAGTCCTAATTAATTTAACGCCAATATTTATACAATTGATTTAAACTTGCTATGTCTGATTGATTC
GTGATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATC
AGCCGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAACAAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCC
CACGATCTGGACTTTCAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCAATCTTGATCGAAAAAT
AAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTGTGTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTAT
ATTTTGATACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCG
GAGGTCTCGATGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCCTGCGCGTCG
TTTACAACGTCGTGACT

>816 Typ2

GAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGAGACTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGT
CGACTCTAGAGGATCTTGTAGACCTCCCGAATTCATGCCAATAATAACTACCTTTTTTCTTGATAGCGACTCAAA
CATTATTTTCTCCTGGGGATCACAATATAAACTACTTTAACTTAATATTTAAACAAAAATCGGGAGTAGCTTTC
AGTTATTAAATAACTACTACTCCCTTAATTTTCGATCAAGATGGCTCTGGTCTACTTAACTATCTTCCCAATCGG
AAGGCCATTTTCAGAGTCCAGACCGTGGGGATATCGGTAGAAGTAGAATCACCAGTTTCTGTGTCTTGTCTATTA
AGAAACGAGCAAAGAAGGGGACTGCTGATCCGGTCGATACCTTGATATTTTGTAGACATAGTAGTTTACTTTTCAG
AAAGCTAATTGTTGGGATTATATCACGAATCGACCCAATATAGCAAGTCTAAATCAATTGTATAAGTAGTTTGAC
ATCCAATCTTAAAAAATCAAGCAATCAAATAGGGAGTAGCTTTTAGTTATTAAATAACTGCTACTCCCTTAAAT
TGTGGATTAAAGATTGCTCTTATCTATTTAAGCATCTTCAAAATCGGAAGGATACTTATAAGTACCAATGAAAGGA
GTAGAATTAGAAGTGTCTTCCCAATCGGAAGGATACTTCATAGTATTAGCGTAAGGAGCAGAATTAGAATTGTT
AGCTTCCACGGCTTGTCTGCTAAGAAACGAGCAAAGAAGGGGACAGCTTTGGGCGCAGAGACTTTAACGTTTTT
AGACATGAGTTAAGTTCCTTTTGTCAATATTGACCTGCGACCAAGATACTACGGACGAACCGGATATGTCAAGGGA
AATCCAGAAAAAATGATTAACTTTTATTAAAAAAGTATCCTTAATCACTAAGATGGTTTGTAGGAGTGAGCAGAA
TTTCAGCGATCGCTCCCGAATTCATGCCAATAATCCCGCTACGGCCATGCGAAACGATCGAGCAGAATTTTCAGC
GATCGGTCTCGATGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCCTGCCCCG
CGTTTACAAC

>790 Typ1

CCGGCATTAGGGCTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAA
TTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCATCGAGACCGATCGCTGAAATTCTGCTCTTTTAGTAATGCTTATTGGCATGA
ATTCCGGGAGCTCCCGAATTCATGCCAATAATAACTACCTTTTTTCTTGATAGCAACTCAAAACATTATTTTCTCCT
GGGTATCAAAATATAAACTACTTTAACTTAATATTTAAACAAAAATCGGGAGTAGCTTTTAGTTATTGAATAAC
TGCTACTCCCTTAATTTTCGATCAAGATGGCTCTGGTCTACTTAACTATCTTCCCAATCGGAAGGCCACTTCAAA
GTCCAGATCGTGGGGATATCGGTAGAAGTAGAATCACCAGTTTCTGTGTCTTGTCTGACAAGAAACGAGCAAAG
AAGGGGACTGCTGATCCGGTCGATACTTTGATATTTTGTAGACATAGTAGTTTACTTTTCAGAAAGCTAATTGTTG
GGATTCTATCAGGAATCAATCAGGATATGTCAAGGGAATCCAGAACAAATGATTAACTTTTATTAAGAAAGTAT
CCTGAATCACTAAGATGTTTTCTGGTTTCTAGGAGTAAGCAGAATTTTCAGCGATCGGTCTACAAGATCCTCTAGA
GTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGAGTATTCTATAGTCTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCTATAGCT
GTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTG
GGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAACCTGTGCG
TGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGAACCCCTTGCGGCCGCCCCGGGCCGTCGACCAATTCTCATGTTTG
ACAGCTTATCATCGAATTTCTGCCATTTCATCCGCTTATTATCACTTATTTCAGCGTAGCACCAGGCGTTTAAGGGC
ACCATACTGCCTTAAAAATACGCCCCGCCTTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTATCATTAGCATCTGCGACTTG
AGCCATCCACACGCATGATGACCTGATTCGCCC

>765 Typ1

AGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTTCGAGCTCGGTACCCG
GGGATCATCGAGACCTCCCGAATTCATGCCAATAATAACTACCTTTTTTCTTGATAGCGACTCAAAACATTATTTT
CTCCCTGGTATCACAATATAAACTACTTTAACTTAATATTTAAACAAAAATCGGGAGTAGCTTTTCAGTTATTAA
ATAACTACTACTCCCTTAATTTTCGATCAAGATGGCTCTGGTCTACTTAACTATCTTCAAAATCGGAAGGCCACT
TCAAAGTCCAGGCCGTGGGGAAATCGGTAGAAGTAGGACCACCAGTTTCTGTGTCTTGTCTGACAAGAAACGAG
CAAAGAAGGGGACTGCTAATCCGGTCGATACCTTGATATTTTGTAGACATAGTAGTTTACTTTTCAGAAAGCTAAT
TGCTGGGATTGTATCACGAATCAACCCGATATAGCAAGTCTAAAGTTAAGTTACTTTTGTAAATATTGACCTGTGA
TCGAGATACTACGGACGAACAGGATAAGTCAAGGGAAATCCAGAACAAATGATTAACTTTTATTAAGAAAGTATC
CTTAATTACTAAGATGTTTTCTGGTTTGTAGGAGTGAGCAGAATTTTCAGCGATCGGTCTACAAGATCCTCTAGAG
TCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGAGTATTCTATAGTCTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCTATAGCTG
TTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGG
GGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAACCTGTGCG
TGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGAACCCCTTGCGGCCGCCCCGGGCCGTCGACC

>758 Typ1

ACGGAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGAGACTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCA
GGTCGACTCTAGAGGATCTTGTAGACCTCCCGAATTCATGCCAATAATAACTACCTTTTTTTCCTGATAGCGACTC
AAACATTATTTTCTCCTGGGGATCACAATATAAACTACTTTAACTTAATATTTAAACAAAAATCGGGAGTAGCT
TTCAGTTATTAAATAACTACTACTCCCTTAATTTTCGATCAAGATGGCTCTGGTCTACTTAACTATCTTCAAAAT
CGGAAGGCCACTTCAAAGTCCAGGCCGTGGGGAAATCGGTAGAAAGTAGGACCACCAGTTTCTGTGTCTTGGCTCTG
ACAAGAAACGAGCAAAGAAGGGGACTGCTAATCCGGTCGATACCTTGATATTTTGTAGACATAGTAGTTTACTTTT
CAGAAAGCTAATTGCTGGGATTGTATCACGAATCAACCCGATATAGCAAGTCTAAAGTTAAGTTACTTTTGTAAAT
ATTGACCTGTGATCGAGATACTACGGACGAACAGGATAAGTCAAGGGAAATCCAGAACAAATGATTAACCTTTTAT
TAAGAAAGTATCCTTAATTACTAAGATGGTTTCTGGTTTGTAGGAGTGAGCAGAATTTTCAGCGATCGGTCTCGAT
GATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGT
CGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAAT
AGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATT
TTCTCCTTACGCATCTGTGTGGTATTTTACACCCGCATATGGTGCCTCTCAGTACATCTGCTCTGATGCCGCATA
GTAAGCCAGCCCCGACACCGCA

>403 Typ2

TCGACGATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGAGACTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA
GAGGATCTTGTAGACCGATCGCTGAAATTCTGCTCCGATCGCTGAAATTCTGCTCACTCCTACAAACCATCTTAG
TGATTAAGGATACTTTTTTAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGTTCGTCCGTAG
TATCTTGGTTCGAGTTCAATATTGCAAAAGGAACCTAACTCATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAG
CTGTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAGTTCTAATTCTACTCCTTTTCATTG
GTACTTATAAGTTTCTTTCTGATTTTGAAGATTTTAAAGTAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTAAGGGAG
TAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGACTTTTTTAACAAAAGTTATCAATTTAAG
GTATTTAATATACTTGACAATTTTGTGATTGTGAATAACTATCTATCCTAAATTTCTTAACATATAGCAAGT
CTAAATGGATTGTACAAAAGACTCGCGGTGATTATTAATCCCCAAAAATATCTATATTCCACTGTAGGGGCGGC
ATCGCCCTACGATGAATTGGATATCAAACACTATTATACAATTGATTTAGACTTGCTATATTGGGTTCGATTCTGTA
TAAATCCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAAACCACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCA
GTCCCCCTTCTTTGCTCGTTTTCTTAATAGAGCAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACG
GTCTGGACTCTGAAATGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAAATTAAGG
GAGTAGTAGTTATTTAATAACTGAAAGCTACTCCCGATTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATATTG
TGATACCAGGGAGAAAATAATGTTTGAGTCGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGC
TCCCGAATTCATGCCAATAAGGCGCCGAGCAGAATTTTCAGCGATCGCTCCCGAATTCATGCCAATAACATGAGCA
GAATTTTCAGCGATCTGTCTCGATGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATT
CACTGGCCGTCGTTTACAACGTCGTGACT

>67 Typ1

ATGGCTCGAGTTTTTTCAGCAAGATCGATCGCTGAATTCTGCTCACTCCTACAAACCAGAAACCATCTTAGTAATT
AAGGATACTTTCTTAATAAAAGTTAATCATTTGTTCTGGATTTCCCTTGACTTATCCTGATTGATTCGTGATAGA
ATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAGCAGTCC
CCTTCTTTGCTCGTTTTCTGTGTCAGTGCAAGACACAGAACTGGCGATTCTACTTCTACCGATATCCCCACGATCT
GGACTTTGAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCCATCTTGATCGAAAAATTAAGGGAGT
AGCAGTTATTCAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTGTTTAAATATTAATTAAGTAGTTTTATATTTTGAT
ACCCAGGAGAAAATAATGTTTGAGTTGCTATCAGGAAAAAAGGTAGTTATTATTGGCATGAATTCGGGAGATCTT
TCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCA
GGCTGTATATTAAAACCTTATATTAAGAACTATGCTAACCACCTCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGTGGGTTTT
CTTGGAATCGACTCTCATGAAAACCTACGAGCTAAATATTCAATATGTTTCCTCTTGACCAACTTTATTTGCATT
TTTTTTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTATTAAAAATTTAAATTTTGAAGAA
AGTTTCAGGGTTAATAGCATCCATTTTTTGTCTTTGCAAGTTCCTCAGCATTCCTTAACAAAAGACGTCTCTTTTGAC
ATGTTTAAAGTTTAAACCTC

>Nies204 Typ3

GCATTTTAGTGATTTCAGGATACTTTTTTAATAAAAGTTAATCATTGTCTGGATTTCCCTTGACATATCCTGTT
CGTCCGTAGTATCTTGGTCGCAGGTCAATATTGCAAAAGGAACCTTAAGTATGTCCAAAAATGTTAAAGTCTCTG
CGCCCAAAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCAGAGCAAGCCGTGGAAGCTAACAATTCTAATTCTGCTC
CTTTCTCTACTTATAAGTATCCTTCCGATTTTGAAGATTTTAAATAGATAAGAGCAATCTTAATCCACAATTTA
AGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGATGGCTTGACTTTTTTAACAAAAGTTATCAA
TTTAAGGTATTTAATATACTTGACAATCCCTGCTGATTGTGAATAACTATCCGTCCTAAATTCCTAGATTATTG
GGTTAAATTTTACTTGACATATCTGGTCACTACTGATAGGATTTTAACAATTAAATTTCTGGAAAGGAACCTAAC
TCATGTCTAAAAATGTTAAAGTCTCTGCGCCCAAAGCAGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTAGCGGAGCAAGCCG
TGGAAGCTAACAATTCTAATTCTGCTCCTTACGGTAATACTATGAAGTATCCTTCCGATTGGGAAGAATATTAA
TAGATAAGAGCAATCTTAATCGAAAATTAAGGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCTATTTGAT
TGCTTGATTTTTTTAAGATTGGATATCAAACTACTTATACAATTGATTTAGACTTGCTATATTGGGTCGATTTCGT
GATAGAATCCCAACAATTAGCTTTCTGAAAAGTAACTACTATGTCTAAAAATATCAAGGTATCGACCGGATCAG
CCGTCCCCTTCTTTGCTCGTTTCTTGTCAGAACAAGACACAGAACTGGTGATTCTACTTCTACCGATATCCCCA
CGATCTGGACTTTCAAGTGGCCTTCCGATTGGGAAGATAGTTAAGTAGACCAGAGCAATCTTGATCGAAAATTAA
GGGAGTAGCAGTTATTTAATAACTAAAAGCTACTCCCGATTTTTGTTTAAATATTAAGTTAAAGTAGTTTTATAT
TGTGATCCCCAGGAGAAAATAATGTTGAGTC

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Mark Frei
Geboren: 01. September 1982
In: Wien
Familienstand: ledig
Staatsbürgerschaft: Österreich

Ausbildungsdaten

1989 – 1993 Volksschule De La Salle Strebersdorf
1993 – 2001 Gymnasium De La Salle Strebersdorf
2001 – 2003 Diplomstudium Elektrotechnik an der Technischen Universität Wien
2003 – 2012 Diplomstudium Biologie an der Universität Wien
2012 – 2013 Diplomarbeit am Limnologischen Institut Mondsee