WOJSKOWY INSTYTUT HIGIENY I EPIDEMIOLOGII im. Gen. Karola Kaczkowskiego

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych



mgr Aleksandra Nakonieczna

Izolacja i analiza nowych bakteriofagów *Bacillus anthracis* oraz charakterystyka funkcjonalna kodowanych przez nie endolizyn

Isolation and analysis of new Bacillus anthracis bacteriophages and functional characterization of their endolysins

Rozprawa doktorska

Promotor: prof. dr hab. Małgorzata Łobocka Promotor pomocniczy: dr Lidia Mizak

Puławy 2023

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania za okazaną pomoc i wsparcie wszystkim Osobom, które przyczyniły się do powstania niniejszej pracy.

Spis treści

Streszczenie
Summary
Wykaz skrótów12
1. WSTĘP
1.1. Bacillus anthracis – czynnik etiologiczny wąglika13
1.1.1. Dekontaminacja powierzchni skażonych przez B. anthracis
1.2. Wąglik16
1.3. Bakteriofagi17
1.3.1. Ogólna charakterystyka17
1.3.2. Morfologia i budowa fagów18
1.3.3. Cykle życiowe fagów
1.3.3.1. Rozwój lityczny
1.3.3.2. Lizogenia
1.3.3.3. Pseudolizogenia
1.3.3.4. Chroniczna infekcja
1.3.3.5. Zakażenie poronne (abortive infection)
1.3.4. Terapia fagowa
1.4. Endolizyny fagowe 23
1.4.1. Ogólna charakterystyka23
1.4.2. Budowa lizyn
1.4.3. Aktywność enzymatyczna lizyn22
1.5. Zastosowanie lizyn24
1.5.1. Leczenie infekcji bakteryjnych24
1.5.2. Zwalczanie biofilmów
1.5.3. Kontrola patogenów w żywności

1.5.4. Kontrola zakażeń w rolnictwie	26
1.6. Zalety i wady stosowania lizyn	27
1.7. Fagi i lizyny <i>B. anthracis</i>	
2. CELE PRACY	
3. ZADANIA BADAWCZE	
4. MATERIAŁY	
4.1. Szczepy bakteryjne	32
4.2. Podłoża mikrobiologiczne	33
4.2.1. Agar tryptonowo-sojowy TSA (pH 7,3)	
4.2.2. Bulion tryptonowo-sojowy TSB (pH 7,3)	
4.2.3. Bulion LB (pH 7,0)	
4.2.4. Agar LA (1,5%) (pH 7,0)	34
4.2.5. Agar półpłynny (0,7%)	34
4.2.6. Agar COLUMBIA z krwią (pH 7,3)	34
4.2.7. Pożywka SOC (pH 6,8-7,0)	34
4.3. Bufory i roztwory	35
4.3.1. Bufor TM	35
4.3.2. Bufory i roztwory do elektroforezy agarozowej	35
4.3.2.1. Bufor TBE 5x do elektroforezy (pH 8,2-8,4)	35
4.3.2.2. Bufor obciążający 6x (bufor próbkowy)	35
4.3.2.3. Bromek etydyny o stęż. 10 mg/ml	35
4.3.3. Bufory i roztwory do elektroforezy poliakrylamidowej SDS-PAGE	35
4.3.3.1. Żel górny (zagęszczający) – 2 ml/dwa żele	35
4.3.3.2. Żel dolny 12% (rozdzielający) - 10 ml/dwa żele	
4.3.3.3. AMPS 10%	
4.3.3.4. Bufor do elektroforezy białek 5x (pH 8,3)	

4.3.3.5.	Bufor obciążający z β-merkaptoetanolem 4x (bufor próbkowy)	36
4.3.3.6.	Bufor obciążający nieredukujący Laemmli 2x	36
4.3.3.7.	Bufor do barwienia żeli – Coomassie Brilliant Blue	37
4.3.3.8.	Bufor do odbarwiania żeli	37
4.3.4. Bufory	do elektroforezy w polu pulsacyjnym PFGE	37
4.3.4.1.	Bufor PL	37
4.3.4.2.	Bufor TE	37
4.3.5. Antybic	tyki	37
4.3.5.1.	Kanamycyna 10 mg/ml	37
4.3.5.2.	Ampicylina 50 mg/ml	38
4.3.6. Bufor d	o dializy	38
4.3.7. PMSF 2	200 mM	38
4.3.8. Bufory	i roztwory do indukcji i oczyszczania białek w warunkach natywnych	38
4.3.8.1.	IPTG 100 mM	38
4.3.8.2.	Bufor do sonikacji (pH 8,0)	38
4.3.8.3.	Bufor lizujący – wiążący (pH 8,0)	38
4.3.8.4.	Bufor płuczący (pH 8,0)	39
4.3.8.5.	Bufor elucyjny (pH 8,0)	39
4.3.8.6.	Bufor MES (pH 5,0)	39
4.3.9. Bufory	do specyficznej detekcji białek metodą Western Blotting	39
4.3.9.1.	Bufor do blottingu (pH 8,1-8,3)	39
4.3.9.2.	Bufor TBS 10x (pH 7,4-7,6)	39
4.3.9.3.	Bufor TBST (pH 7,4-7,6)	39
4.3.9.4.	Bufor TBST z mlekiem	40
4.3.10. Bufor	do renaturacji	40
5. METODY		41

5.1. Poszukiwanie nowych bakteriofagów specyficznych wobec laseczki wąglika
oraz ich charakterystyka41
5.1.1. Metoda płytek dwuwarstwowych41
5.1.2. Izolacja bakteriofagów z próbek środowiskowych41
5.1.3. Oczyszczanie bakteriofagów oraz określenie ich zakresu gospodarza41
5.1.4. Mianowanie bakteriofagów41
5.1.5. Ustalenie optymalnego współczynnika infekcji (MOI) oraz namnażanie bakteriofagów
5.1.6. Mikroskopia elektronowa
5.1.7. One Step Growth (OSG, jednostopniowy wzrost)43
5.1.8. Adsorpcja bakteriofagów do komórek gospodarza43
5.1.9. Badanie wrażliwości bakteriofagów na zmiany pH i temperatury43
5.1.10. Elektroforeza w polu pulsacyjnym (PFGE)44
5.1.11. Izolacja oraz pomiar stężenia DNA45
5.1.12. Trawienia restrykcyjne DNA bakteriofagowego45
5.1.13. Elektroforeza agarozowa DNA45
5.1.14. Sekwencjonowanie DNA bakteriofagów45
5.2. Analiza genomów bakteriofagów oraz porównawcza analiza genomowa
z podobnymi bakteriofagami46
5.2.1. Adnotacje genomów fagowych46
5.2.2. Ustalenie sekwencji i struktury końców cząsteczek DNA wirionów46
5.2.3. Analiza sekwencji przewidzianych białek bakteriofagów46
5.2.4. Analiza filogenetyczna oraz porównawcza genomów bakteriofagowych47
5.3. Otrzymanie kodowanych przez bakteriofagi białek o aktywności litycznej (endolizyn)
5.3.1. Metoda klonowania molekularnego oraz dobór wektora
5.3.2. Zaprojektowanie fragmentów do klonowania oraz starterów do reakcji PCR50
5.3.3. Amplifikacja wektora metodą PCR52

5.3.4. Amplifikacja wstawki metodą PCR i sekwencjonowanie produktu	.53
5.3.5. Ligacja fragmentów metodą składania Gibsona (Gibson Assembly)	.54
5.3.6. Transformacja komórek kompetentnych E. coli NEB 5-alpha produktem ligacji	54
5.3.7. PCR kolonijny	.55
5.3.8. Izolacja plazmidowego DNA	.56
5.3.9. Potwierdzenie obecności wklonowanych genów	.57
5.3.10. Transformacja komórek kompetentnych <i>E. coli</i> BL21 konstruktami wektora z wklonowanym genem	.57
5.3.11. Indukcja ekspresji genów endolizyn i liza komórek bakteryjnych	.58
5.3.12. Oczyszczanie endolizyn na złożu niklowym Ni-NTA w warunkach natywnych	.59
5.3.13. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym	.59
5.3.14. Immunodetekcja endolizyn za pomocą metody Western Blotting	.60
5.3.15. Dializa i zagęszczanie białek za pomocą probówek Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Unit	.60
5.3.16. Oznaczanie stężenia białka w roztworze metodą Bradforda	.61
5.4. Badanie aktywności litycznej otrzymanych endolizyn	.61
5.4.1. Zymogram	.61
5.4.1.1. Przygotowanie preparatu ścian komórkowych B. anthracis 34F2	.62
5.4.2. Metoda płytkowa	.62
5.4.2. Redukcja gęstości optycznej zawiesin bakterii	.62
6. WYNIKI	64
6.1. Charakterystyka wyizolowanych bakteriofagów	.64
6.1.1. Izolacja i ocena zakresu gospodarza badanych bakteriofagów	.64
6.1.2. Wybór bakteriofagów do dalszych badań	.64
6.1.3. Mikroskopia elektronowa	.65
6.1.4. Optymalne MOI	.66

6.1.5.	Krzywa adsorpcji nowych bakteriofagów do komórek gospodarza oraz krzywa One Step Growth (OSG, krzywa jednostopniowego wzrostu)
6.1.6.	Określenie wrażliwości nowych bakteriofagów J5a, F16Ba i z1a na zmiany pH i temperatury
6.2. Ana	aliza genomów trzech nowych bakteriofagów J5a, F16Ba i z1a oraz
621	Ogálna charakterystyka genomów nowych bakteriofagów 67
6.2.2.	Ustalenie sekwencji i struktury końców cząsteczek DNA bakteriofagów J5a, F16Ba i z1a
6.2.3.	Analiza sekwencji przewidzianych białek nowych bakteriofagów J5a, F16Ba i z1a
6.2.4.	Analiza filogenetyczna
6.2.5.	Analiza porównawcza genomów nowych bakteriofagów J5a, F16Ba i z1a87
6.2.6.	Porównanie endolizyn i holin kodowanych przez nowe bakteriofagi z kodowanymi przez podobne fagi z rodzaju <i>Wbetavirus</i>
6.3. Otr (ene	zymanie kodowanych przez bakteriofagi białek o aktywności litycznej dolizyn)
6.3.1.	Klonowanie genów kodujących zmodyfikowane endolizyny bakteriofagów J5a, F16Ba i z1a w wektorze ekspresyjnym95
6.3.2.	Ekspresja genów kodujących zmodyfikowane endolizyny bakteriofagów J5a, F16Ba i z1a97
6.3.3.	Oczyszczanie zmodyfikowanych endolizyn LysJ i LysF98
6.4. Oce	ena aktywności litycznej zmodyfikowanych endolizyn LysJ i LysF99
6.4.1.	Zymogram
6.4.2.	Metoda płytkowa
6.4.3.	Redukcja gęstości optycznej zawiesin komórek szczepów B. anthracis101
6.4.4.	Redukcja gęstości optycznej zawiesin komórek wybranych szczepów z rodzaju <i>Bacillus</i> niezaliczanych do gatunku <i>B. anthracis</i>

6.5. Analiza sekwencji aminokwasowych zmodyfikowanych endolizyn LysJ
i LysF107
6.6. Porównanie zakresu działania zmodyfikowanych endolizyn LysJ i LysF ze
specyficznością kodujących je bakterioragów 35a i Froba
7. DYSKUSJA
8. PODSUMOWANIE I WNIOSKI
9. UPOWSZECHNIANIE WYNIKÓW I FINANSOWANIE BADAŃ 122
10. BIBLIOGRAFIA124
11. ZAŁĄCZNIKI
Spis rysunków 152
Spis tabel155
Spis załączników156

Streszczenie

Wąglik jest poważną, często śmiertelną chorobą odzwierzęcą wywoływaną przez przetrwalnikującą laseczkę *Bacillus anthracis*, występującą zwykle w glebie w środowisku roślinożerców (tj. owiec, bydła, kóz). Naturalne infekcje u ludzi występują głównie w wyniku kontaktu z zakażonymi produktami zwierzęcymi (np. mięso, wełna lub skóry). Zalecana procedura leczenia polega na długiej antybiotykoterapii, a jej skuteczność jest warunkowana szybkością podania leku. Szczepy *B. anthracis* o naturalnie lub sztucznie wykształconej antybiotykooporności mogą być potencjalnie użyte w ataku bioterrorystycznym, a rozprzestrzenianie się spor może prowadzić do poważnego i długotrwałego skażenia gleby i powierzchni.

Bakteriofagi oraz ich enzymy lityczne, endolizyny (lizyny), mogą stać się pomocne w walce z *B. anthracis*, a także znaleźć zastosowanie w dezynfekcji, dekontaminacji lub w testach identyfikacji i wykrywania laseczki wąglika. W ramach niniejszej pracy wyizolowano i opisano trzy nowe bakteriofagi, J5a, F16Ba i z1a, które okazały się specyficzne wobec *B. anthracis*. Fagi te reprezentują nowe gatunki. Ich genomy zsekwencjonowano, a otrzymane cząsteczki DNA oraz sekwencje przewidywanych białek zostały dokładnie przeanalizowane, z uwzględnieniem filogenetycznej i genomowej analizy porównawczej względem 10-ciu najbardziej podobnych fagów wąglikowych. Przeprowadzono podstawową charakterystykę biologiczną wyizolowanych fagów, w tym określono ich morfologię, szybkość adsorpcji, cykl replikacji, a także stabilność w różnych warunkach pH i temperatury. Wykazano, że nowe fagi charakteryzują się szybkim czasem namnażania i wysoką stabilnością w zmieniających się warunkach zewnętrznych. Określono ponadto typ i sekwencję nukleotydową końców czasteczek DNA wirionów, a także mechanizm pakowania DNA do kapsydów.

Nowe fagi kodują nieopisane dotąd endolizyny, wyraźnie różniące się od tych kodowanych przez najbardziej znane fagi wąglikowe: Gamma, Cherry, Fah, AP631 i Wbeta. Geny kodujące nowe lizyny sklonowano i poddano ekspresji w *E. coli*. Dwa z ich produktów, lizynę faga J5a i faga F16Ba, otrzymano w postaci oczyszczonych preparatów białkowych, po czym zbadano ich aktywność względem sześciu szczepów *B. anthracis* i 33 innych szczepów *Bacillus*. Obie lizyny powodowały wyraźne i szybkie zależne od stężenia zmniejszanie gęstości optycznej zawiesin testowanych szczepów laseczki wąglika (w tym szczepów zjadliwych), co wskazuje na ich potencjał do zabijania tego patogenu. Zmniejszały również gęstość optyczną zawiesin komórek niektórych innych gatunków *Bacillus*, w tym szczepu *B. subtilis*, co wskazało na ich szerszy zakres gospodarza niż zakres gospodarzy fagów, z których pochodzą.

Fagi specyficzne dla laseczki wąglika nie są w przyrodzie zbyt rozpowszechnione, wykazują też niewielką różnorodność genetyczną. Wyizolowanie i opisanie nowych fagów znacznie wzbogaciło dotychczasowy stan wiedzy w tej dziedzinie.

Summary

Anthrax is a serious, often fatal zoonotic disease caused by *Bacillus anthracis*, a sporeforming rod typically found in soil within the environment of herbivores (i.e., sheep, cattle, and goats). Natural human infections occur mainly in people exposed to infected animal products (e.g., meat, wool or hides). The recommended treatment procedure relies mainly on a long antibiotic therapy which must be administered immediately after the exposure. *B. anthracis* strains with naturally or artificially developed antibiotic resistance can be potentially used in a bioterrorist attack and spore dissemination can lead to serious and long-lasting soil and surface contamination.

Phages and their lytic enzymes, endolysins (or lysins), can be potentially utilized in the fight against anthrax bacilli but also they can be used as disinfectants and decontaminants or find use in *B. anthracis* identification and detection assays. In this thesis, three new isolated phages specific against *B. anthracis*, J5a, F16Ba and z1a, were described. Each of them represents a new species. Their genomes were sequenced and the obtained DNA molecules and the sequences of their predicted proteins were thoroughly analyzed, including phylogenetic and genomic comparison against 10 other most similar anthrax phages. The basic biological characteristics of the isolated phages including determination and description of their morphology, adsorption, replication, and also pH and thermal stability were also performed. The new phages showed quick progeny production and high stability in changing external conditions. Moreover, their DNA termini type and their sequences, along with the DNA packaging mechanism were determined.

Nucleotide sequences of the new phages endolysins are noticeably different from those encoded by most known anthrax phages: Gamma, Cherry, Fah, AP631, and Wbeta. Genes encoding these proteins were cloned and expressed in *E. coli*. J5a phage- and F16Ba phage-derived lysins were obtained, purified and also tested against six *B. anthracis* strains and 33 other *Bacillus* strains. Both proteins showed distinct and quick concentration-dependent optical density reduction of the tested anthrax strains suspensions (incl. virulent strains) indicating their ability to kill this pathogen. However, they were also able to reduce the optical density of some other *Bacillus* strains, like *B. subtilis*, which demonstrated their broader host range in comparison to their respective phages.

B. anthracis-specific phages are not very common in nature and show little genetic diversity. Isolating and describing new anthrax phages significantly enriched the current state of the art in the field of their biology.

Wykaz skrótów

- aa ang. *amino acid(s)*, aminokwas(-y)
- BLAST ang. Basic Local ALignment Search Tool
- bp ang. base pair, par zasad
- BWA ang. biowarfare agent, czynnik broni biologicznej
- CBD ang. cell-binding domain, domena wiążąca do komórki bakteryjnej
- CDS ang. coding DNA sequence, region kodujący
- CFU ang. colony forming unit, jednostka tworząca kolonię
- FDA Food and Drug Administration
- GA ang. Gibson Assembly
- kb ang. kilobase, tysiąc par zasad
- MDR ang. multidrug resistant (bacteria), bakterie wielolekooporne
- MOI ang. Multiplicity Of Infection, optymalny współczynnik infekcji
- NCBI National Center for Biotechnology Information
- nt nukleotyd(-y)
- OD ang. optical density, gęstość optyczna
- ORF ang. open reading frame, otwarta ramka odczytu
- PBS ang. phosphate buffered saline, zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
- pDNA plazmidowe DNA
- PFGE ang. Pulsed Field Gel Electrophoresis, elektroforeza żelowa w polu pulsacyjnym
- PFU ang. plaque forming unit, jednostka tworząca łysinkę
- rpm ang. revolutions per minute, obroty na minutę
- TEM ang. transmission electron microscopy, elektronowy mikroskop transmisyjny

1. WSTĘP

1.1. Bacillus anthracis – czynnik etiologiczny wąglika

Bacillus anthracis to przetrwalnikująca Gram-dodatnia laseczka, występująca zwyczajowo w glebie w środowisku zwierząt roślinożernych (tj. owiec, bydła i kóz) [28], o średnich rozmiarach $1-1,5 \times 3-10 \mu m$. Należy do grupy *Bacillus cereus*. Grupa ta jest wysoce jednorodną podgrupą rodzaju *Bacillus*, a jej głównymi członkami są *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* i *Bacillus thuringiensis*. Szczepy *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* i *Bacillus weihenstephanensis* to drugorzędowe gatunki należące do tej grupy [147, 151]. Chociaż większość gatunków z tej grupy uważa się za niepatogenne [27], to szczepy *B. cereus* i *B. anthracis* są przyczyną poważnych chorób u ludzi. Laseczka wąglika jest prawdopodobnie najbardziej znanym z tych gatunków będąc przyczyną wąglika, poważnej, często śmiertelnej choroby odzwierzęcej.

Cechą powszechnie uważaną za różnicującą *B. anthracis* od gatunków pokrewnych jest obecność czynników wirulencji, tj. dwóch egzotoksyn (toksyny letalnej wywołującej nekrozę tkanek i toksyny obrzękowej) oraz otoczki złożonej z kwasu poli-γ-D-glutaminowego [102]. Związek ten chroni bakterię przed fagocytozą i odpowiada za nieimmunogenność bakterii. Toksyny i składnik otoczki są kodowane przez dwa różne plazmidy, odpowiednio pXO1 i pXO2. Szczepy *B. anthracis* pozbawione plazmidów jako głównych nośników genów czynników wirulencji są jednak nadal zdolne do wywoływania silnego zapalenia i śmiertelności, jak wykazano w mysim modelu infekcji [5]. Na poziomie genomowym szczepy *B. anthracis* są tak podobne do niektórych innych gatunków z grupy *B. cereus*, iż uważa się, że dopiero niedawno wyewoluowały jako osobny gatunek. Ponadto w obrębie gatunku szczepy *B. anthracis* wykazują niewielkie zróżnicowanie genetyczne, przypuszczalnie w wyniku długich okresów spoczynku w postaci przetrwalników w glebie [144]. Endospory *B. anthracis* są niezwykle odporne na trudne warunki środowiskowe, dzięki czemu mogą przetrwać w glebie przez wiele lat i zarażać pasące się zwierzęta [91].

Ze względu na wysoką zachorowalność i śmiertelność, niską dawkę zakaźną, względną łatwość wytwarzania oraz trudność w wykrywaniu i dekontaminacji, laseczka wąglika, zwłaszcza w postaci przetrwalników, stanowi jedno z największych zagrożeń bronią biologiczną. Z tego powodu gatunek *B. anthracis* został zaliczony przez amerykańskie CDC (Center for Disease Control and Prevention) do kategorii A patogenów. Mimo, że naturalnie występujące przypadki są bardzo nieliczne (na przykładzie krajów europejskich patrz **Ryc. 1**), to w przypadku celowego uwolnienia zarodników w formie aerozolu lub skażenia wody pitnej istnieje duże zagrożenie dla bezpieczeństwa danego kraju i zdrowia publicznego [134].



Rycina 1. Liczba przypadków zakażeń laseczką wąglika zgłoszonych w krajach Unii Europejskiej w latach 2007-2021 (źródło - http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=5).

Obecnie, według CDC, zalecanym postępowaniem w przypadku infekcji laseczką wąglika jest antybiotykoterapia o szerokim spektrum działania lub terapia antytoksynami. Aby chronić przed opóźnionym kiełkowaniem spor podawanie antybiotyku (penicylina, doksycyklina, ciprofloksacyna) może jednak trwać nawet do 60 dni i może wymagać podawania dożylnego. Dodatkowo szansa na pełne wyzdrowienie zwiększa się poprzez uzyskanie opieki medycznej w krótkim czasie po ekspozycji [84]. Niestety, stosowanie antybiotyków u zwierząt, które następnie były grzebane w ziemi sprzyja wykształcaniu antybiotykooporności przez bakterie, przez co skuteczność leczenia może spadać. Sama dekontaminacja skażonego środowiska jest z kolei również ogromnym wyzwaniem. Można w tym celu stosować formaldehyd lub kwas nadoctowy, jednak związki te użyte w dużej ilości są nieprzyjazne środowisku.

Można założyć, iż szczepy *B. anthracis* o naturalnie lub sztucznie (poprzez modyfikacje genetyczne) wykształconej antybiotykooporności mogą być potencjalnie wykorzystane w ataku bioterrorystycznym, jako broń masowego rażenia [141]. Dlatego też w interesie publicznym leży opracowywanie nowych, szybkich środków przeciwbakteryjnych przeciwko *B. anthracis*, o innych mechanizmach działania niż powszechnie stosowane antybiotyki. Bakteriofagi i ich enzymy lityczne, endolizyny (lizyny), mogą stać się takimi czynnikami ze względu na ich wysoką specyficzność i aktywność wobec bakterii opornych na antybiotyki. Jednakże małe zróżnicowanie genetyczne szczepów wąglikowych, a także ich bliskie spokrewnienie z podobnymi gatunkami z grupy sprawia, że szanse na znalezienie nowych fagów specyficznie

infekujących *B. anthracis* są ograniczone oraz że niektóre fagi infekujące *B. anthracis* mogą infekować również szczepy z grupy *B. cereus*.

1.1.1. Dekontaminacja powierzchni skażonych przez B. anthracis

Osobnym zagadnieniem związanym z laseczką wąglika jest problem dekontaminacji skażonych powierzchni lub terenów. W przypadku intencjonalnego użycia tej bakterii, np. w formie aerozolu, przeprowadzenie skutecznej dekontaminacji może być trudne i długotrwałe, a przede wszystkim może wymagać stosowania szkodliwych dla zdrowia i środowiska środków. Jednym z historycznych przykładów jest proces odkażania placówki pocztowej Departamentu Sprawiedliwości USA w Landover w stanie Maryland po przeprowadzonych w 2001 r. atakach terrorystycznych z użyciem przetrwalników *B. anthracis*. Placówka, a także inne miejsca zostały skażone sporami laseczki wąglika [22, 82]. Departament Sprawiedliwości USA zdecydował o wykorzystaniu wodnego roztworu dwutlenku chloru do odkażania stałych, nieporowatych powierzchni oraz paraformaldehydu do fumigacji części wyposażenia pocztowego [20, 190]. Placówka pozostawała zamknięta przez prawie pięć miesięcy, a same czynności porządkowe trwały około trzech miesięcy [24, 32]. Stężone środki na bazie chloru, dwutlenek chloru, tlenek etylenu, nadtlenek wodoru, kwas nadoctowy, bromek metylu i paraformaldehyd znalazły się wśród środków dezynfekujących stosowanych podczas tego przedsięwzięcia [182]. Kluczową lekcją wyciągniętą z ataków biologicznych z użyciem spor laseczki wąglika w 2001 r. było to, że środki zaradcze, w tym fumigacje, są złożone, czasochłonne i kosztowne [152, 190]. Innym historycznym przykładem jest dekontaminacja szkockiej wyspy Gruinard. Wyspa ta, położona ok. 1 km od lądu, była w 1942 r. w czasie II Wojny Światowej miejscem prób z użyciem spor laseczki wąglika przeprowadzonych przez wojskowych badaczy z brytyjskiego Porton Down. Doświadczenia polegające na zakażaniu owiec za pomocą bomb zawierających spory, a następnie niepowodzenie dekontaminacji z powodu zbyt wysokiego ryzyka oraz kosztów doprowadziły do potężnego skażenia gleby i sprawiły, iż przez kolejne ponad 40 lat niemożliwe było zasiedlenie wyspy [44]. Proces jej odkażania rozpoczęto dopiero w 1986 r. wykorzystując 280 ton formaldehydu w postaci 5% roztworu w wodzie morskiej, którym spryskano obszar ok. 200 hektarów [118]. Wyspa Gruinard została uznana za bezpieczną do zamieszkania dopiero 4 lata później. Powyższe przykłady są bardzo wymowne i pokazują, jak wielkie problemy i straty może przynieść rozprzestrzenienie spor tak groźnego patogenu, jak czynnik etiologiczny wąglika. Dlatego tak ważne i potrzebne jest opracowywanie nowych i bezpiecznych metod odkażania. Stąd, zarówno w procesie zwalczania zakażeń wywołanych laseczką wąglika, jak i w dekontaminacji, zastosowanie bakteriofagów lub ich endolizyn wydaje się być dobrą i biologicznie przyjazna alternatywa badź uzupełnieniem aktualnie przyjętych strategii.

1.2. Wąglik

Wąglik to choroba, która dotyka głównie zwierzęta wypasające się, jednak może być również przenoszona na człowieka. Jej obraz kliniczny u ludzi zależy od drogi wniknięcia patogenu. Istnieją trzy główne formy wąglika: skórna, inhalacyjna (wziewna) i żołądkowo-jelitowa (pokarmowa):

- <u>Skórna:</u> jest to najbardziej powszechnie występująca forma wąglika u ludzi (95%, [63]). Naturalne infekcje u ludzi występują szczególnie u osób narażonych zawodowo, mających kontakt z zakażonymi zwierzętami lub ich produktami (np. mięso lub skóry), jak również ze skażonym środowiskiem [41]. Zadrapania lub uszkodzenia skóry spowodowane przez owady mogą sprzyjać zakażeniom. Objawy pojawiają się zwykle w ciągu jednego dnia i należą do nich miejscowe stany zapalne oraz czarne nekrotyczne uszkodzenia skóry.
- <u>Inhalacyjna</u>: występuje rzadziej, ale w przypadku ludzi jest najgroźniejsza (Tabela 1). Dochodzi do niej poprzez wdychanie spor z powietrza, a przebieg zakażenia zależy od podatności gospodarza, dawki oraz drogi penetracji. W przypadku zwierząt ma miejsce wdychanie spor prosto z ziemi podczas wypasania. Dawka wziewna infekcyjna wynosi 6000-8000 spor, zaś dawka wziewna śmiertelna to 10 000-20 000 spor. Objawy są podobne do ostrego zapalenia płuc i włączają ostry obrzęk płuc, wysoką gorączkę, dreszcze, duszności, kaszel. Okres inkubacji choroby wynosi 1-7 dni (może być dłużej);
- <u>Pokarmowa</u>: droga wniknięcia spor wiedzie przez układ pokarmowy i następuje po spożyciu zakażonego pokarmu, karmy, paszy, czy wody. Wrotami zakażenia są mikrouszkodzenia w śluzówce ust, gardła lub wzdłuż całego układu. Objawy formy ustno-gardłowej to: powiększenie węzłów chłonnych, obrzęk oraz sepsa rozwijająca się po owrzodzeniu gardła lub przełyku. Objawy formy brzusznej (częstsza) to ból brzucha i wymioty pojawiające się po kilku dniach.

	Ludzie nieleczeni	Ludzie leczeni
Forma skórna	1-20%	poniżej 1%
Forma inhalacyjna	86-89%	75%
Forma pokarmowa	25-60%	b. d.

Tabela 1. Śmiertelność po drugim dniu od zakażenia laseczką wąglika [63, 188].

Zachorowania na wąglik są nieodłącznie obecne w statystykach przypadków chorób zakaźnych na świecie, z rocznym występowaniem około 20 000–100 000 przypadków w pierwszej połowie XX wieku [128] oraz roczną globalną częstością występowania między 2000 a 20 000 przypadków w XXI wieku, jak szacuje WHO [169]. Do walki z chorobą stosowano

różne antybiotyki. Jednak w przypadku niektórych patogenów będących możliwymi czynnikami broni biologicznej, jak *Yersinia pestis*, niektóre izolaty *Brucella*, czy właśnie *B. anthracis*, odnotowano oporność wobec różnych antybiotyków [10, 98, 123], dlatego pilnie potrzebne jest opracowywanie nowych środków terapeutycznych [108]. Dostępne są szczepionki dla ludzi i zwierząt, które zapobiegają zakażeniom laseczką wąglika i powstrzymują jej przenoszenie z zakażonych zwierząt na ludzi lub zdrowe zwierzęta [12]. Jednak chociaż różne szczepionki są w trakcie opracowywania, do tej pory tylko jedna została zatwierdzona przez FDA. Jest to Anthrax Vaccine Adsorbed (AVA) o nazwie handlowej BioThrax. Aktywnym składnikiem farmaceutycznym tej szczepionki jest antygen ochronny (PA) kodowany przez wirulentny plazmid pXO1. Niestety istnieje kilka problemów i ograniczeń związanych ze stosowaniem BioThrax, takich jak brak standaryzacji, wysoki koszt produkcji, trudność oceny jej skuteczności, konieczność wielokrotnego dawkowania i związane z tym przejściowe skutki uboczne [12]. Zalecane jest przyjęcie sześciu dawek preparatu w odstępie 18 miesięcy, co bardzo wydłuża okres nabywania odporności, a dodatkowo jest uciążliwe [198].

1.3. Bakteriofagi

1.3.1. Ogólna charakterystyka

Bakteriofagi (fagi) to wirusy specyficznie infekujące bakterie. Są one najbardziej rozpowszechnionymi organizmami w przyrodzie, już od pewnego czasu powszechnie uznawanymi za formy żywe. Odgrywają, kluczową rolę w ekologii, kształtowaniu różnorodności drobnoustrojów w przyrodzie oraz ewolucji ich bakteryjnych gospodarzy [119].

Co ważne, fagi zdolne są do replikacji wyłącznie w komórkach bakterii, zatem nie stanowią zagrożenia dla komórek eukariotycznych. Po eliminacji lub zmniejszeniu populacji bakterii chorobotwórczych, ich miano stopniowo spada, aż do całkowitego ich usunięcia z organizmu. Celem dla białek receptorowych fagów mogą być następujące struktury powierzchniowe bakterii: LPS (lipopolisacharyd), kwasy tejchojowe, peptydoglikan, białka błony zewnętrznej i otoczki, rzęski, pilusy płciowe oraz fimbrie typu IV [68]. Dodatkowo wysoka specyficzność fagów najczęściej ograniczona do jednego gatunku, a czasami nawet szczepu bakterii sprawia, że nie naruszają one naturalnej mikroflory organizmów żywych. Wszystkie wymienione cechy, jak również fakt, iż fagi są obecne we wszystkich środowiskach naturalnych (wszędzie tam, gdzie występują bakterie), skąd można je izolować, podkreślają unikatową naturę fagów oraz dowodzą ich ogromnego potencjału w walce z infekcjami bakteryjnymi w czasach powszechnej i narastającej antybiotykooporności bakterii.

1.3.2. Morfologia i budowa fagów

Morfologia oraz typ kwasu nukleinowego to dwa z kilku kryteriów klasyfikacji fagów [189]. Materiałem genetycznym zamkniętym w białkowym lub białkowo-lipidowym kapsydzie moze być jedno- lub dwuniciowe DNA lub RNA. Ok. 95% wszystkich fagów zawiera dsDNA jako materiał genetyczny. W kapsydzie może znajdować się pojedyncza kopia genomu, może też być wiecej kopii, przy czym zakończenie nici DNA nie zawsze wypada w miejscu zakończenia pojedynczej czasteczki genomu. Morfologia bakteriofagów jest bardzo zróżnicowana (Ryc. 2). Zdecydowaną większość (ok. 96,3%) stanowią formy ogonkowe. Mają one liniowe, dwuniciowe DNA. Obowiązujący do niedawna system klasyfikacji zaliczał je do jednego rzędu (Caudovirales), w obrębie którego wydzielano trzy rodziny: Podoviridae (z bardzo krótkim ogonkiem), Myoviridae (z długim, kurczliwym ogonkiem) oraz Siphoviridae (z długim, niekurczliwym ogonkiem). Obecnie bakteriofagi ogonkowe zaliczane są do oddzielnej klasy -*Caudoviricetes*, a spośród dotychczasowych trzech rodzin, na podstawie analizy filogenetycznej wydzielono dodatkowe, ograniczając poprzednią klasyfikację do opisu morfotypów (podovirus, myovirus i siphovirus) [181]. Najbardziej licznie reprezentowany jest ostatni z morfotypów. Ogonek tych fagów jest zwykle giętki i zakończony płytką podstawną oraz kilkoma włókienkami, zaangażowanymi w proces adsorpcji faga do komórki bakteryjnej (**Ryc. 3**).



Rycina 2. Typy morfologii fagów z podziałem na rodzaj materiału genetycznego w wirionach [13].



Rycina 3. Morfologia fagów na przykładzie faga ogonkowego o morfotypie myowirusa (lewa strona obrazu) i siphowirusa (prawa strona obrazu). Widoczna skurczona pochewka białkowa myowirusa (źródło - http://animals-partner.blogspot.com/2014/12/bacteriophage.html oraz zdjęcia fagów z kolekcji Pracowni Bakteriofagowej Ośrodka Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych WIHE).

1.3.3. Cykle życiowe fagów

Chociaż najlepiej poznane mechanizmy replikacji fagów odpowiadają dwóm strategiom rozwoju, rozwojowi litycznemu i lizogenii (lizogenicznemu), istnieją inne strategie rozwojowe, w tym pseudolizogenia (zakażenie ciągłe) i zakażenie przewlekłe (ciągłe uwalnianie potomstwa bez towarzyszącej mu lizy bakterii). Są one charakterystyczne dla określonych fagów lub mają miejsce wtedy, gdy gospodarzom brakuje składników odżywczych [66]. Różne strategie rozwoju fagów różnią się dalszym przebiegiem zdarzeń po infekcji, wpływając na ekspresję genów genomu fagowego, komórkę bakteryjną oraz powstanie potomnych wirionów. Poniżej wymieniono kilka z nich.

1.3.3.1. Rozwój lityczny

Fagi bezwarunkowo lityczne, zwane często zjadliwymi, adsorbują się do powierzchni komórki gospodarza, wprowadzają do niej swój kwas nukleinowy, replikują go, a po transkrypcji i translacji dochodzi do składania kompletnych wirionów, które w ostatecznym etapie rozwoju, jakim jest liza komórki bakteryjnej, uwalniane są do środowiska jako dojrzałe fagi potomne. Rozprzestrzenione w środowisku nowe fagi infekują i zabijają następnie kolejne komórki bakteryjne [72].

1.3.3.2. Lizogenia

Lizogenia jest alternatywną dla rozwoju litycznego strategią namnażania tzw. fagów łagodnych. Po infekcji mogą one rozwijać się drogą rozwoju litycznego lub zapoczątkowywać stan lizogenii. Na początku tego stanu genom faga integruje się z genomem bakteryjnym jako tzw. profag i z nim replikuje. Alternatywnie profag może egzystować w komórce w formie plazmidu. W tej postaci fag może pozostać uśpiony przez wiele pokoleń bakterii, lecz w pewnych

warunkach (w warunkach stresowych lub spontanicznie) jego DNA może zostać wycięty z DNA bakterii i zapoczątkować rozwój lityczny [174]. Decyzja o wyborze strategii namnażania zależy od wielu czynników. Jeśli w otoczeniu istnieje kilka innych infekujących fagów (lub jeśli jest duża liczebność faga), lizogenia jest bardziej prawdopodobna. Wybór ten może pomóc zmniejszyć ogólny stosunek liczby fagów do bakterii, a tym samym zapobiec zabiciu gospodarzy przez fagi, czyli zwiększyć szansę przetrwania fagów. Czynniki uszkadzające DNA, jak promieniowanie UV lub chemikalia, a także temperatura, pH, ciśnienie osmotyczne i niskie stężenie składników odżywczych, mogą zaindukować rozwój lityczny profaga [149]. Obecność profaga chroni bakteryjnego gospodarza od dalszych infekcji takim samym fagiem.

1.3.3.3. Pseudolizogenia

W pseudolizogenii zachodzi infekcja bakterii, lecz fag ani nie rozwija sie drogą rozwoju litycznego ani nie wchodzi w stan lizogenii. Zjawisko to jest zazwyczaj wywołane przez niekorzystne dla bakterii warunki, np. głód i kończy się w momencie zainicjowania lizogenii lub rozwoju litycznego, kiedy warunki wzrostu dla bakterii ulegną poprawie. Genom fagowy do tego czasu nie ulega degradacji i pozostaje obecny w komórce [115].

1.3.3.4. Chroniczna infekcja

Potomstwo fagowe jest przez długi czas stale i powoli uwalniane przez osłony komórki bakteryjnej, bez jej zabijania. Jest to zjawisko rozpowszechnione wśród fagów nitkowatych (filamentokształtnych) [33].

1.3.3.5. Zakażenie poronne (abortive infection)

Mianem zakażenia poronnego określa się zakażenie, w wyniku którego nie dochodzi do rozwoju faga. Zamiast tego następuje śmierć zakażonej komórki. Jest ona wynikiem działania mechanizmów obrony bakterii przed fagiem. Zakażona komórka "popełnia samobójstwo" zanim fag może zakończyć swój rozwój. Mechanizm ten zapobiega rozprzestrzenianiu się infekcji fagowej na pobliskie komórki, chroniąc w ten sposób daną populację bakteryjną [115].

1.3.4. Terapia fagowa

Po odkryciu fagów w 1915 r. terapia fagowa była szeroko praktykowana w latach 20stych i 30-stych ubiegłego wieku, a do dziś fagi są rutynowo stosowane w obrębie niektórych rejonów Europy wschodniej do leczenia różnych infekcji bakteryjnych. Chociaż początkowo fagi były ignorowane w krajach zachodnich ze względu na sukces antybiotykoterapii oraz niektóre wczesne niepowodzenia kliniczne fagoterapii, rosnący problem oporności bakterii na antybiotyki spowodował renesans terapii opartej na użyciu fagów, których mechanizm działania jest zupełnie inny od antybiotyków. Wynika to częściowo z ich wysoce specyficznego charakteru, jak również ich powszechnego występowania w przyrodzie [132]. Terapia fagowa to jedna z najstarszych, potwierdzonych naukowo metod zwalczania zakażeń bakteryjnych. Fagi mogą zabijać bakterie poprzez ich lizę, a dodatkowo wspierać rozwój odpowiedzi zapalnej przeciwko bakteriom dzięki uwolnionym poprzez lizę fragmentom ściany komórkowej bakterii [80]. Dlatego terapia fagowa, czyli podawanie pacjentom z zakażeniami bakteryjnymi koktajli fagowych, oprócz bezpośredniej eliminacji komórek bakteryjnych lub zmniejszenia ich miana, dodatkowo aktywuje układ odpornościowy człowieka do walki z infekcją [139]. Poza specyficznością, bardzo istotną zaletą stosowania fagów jest ich zdolność do replikacji w miejscu infekcji, dzięki czemu fagi po podaniu trafiają do miejsca toczącego się zakażenia i tam utrzymują swój poziom tak długo, jak obecne są tam wrażliwe na nie bakterie. [138].

Fagi są stosowane terapeutycznie w leczeniu infekcji, które nie reagują na konwencjonalne leczenie antybiotykami obecnie szczególnie w Rosji i Gruzji [140]. W tych krajach produkty fagowe są łatwo dostępne, nawet bez recepty (np. Intestiphage) [2]. Przykładem jest działalność rosyjskiej firmy Microgen, która sprzedaje fagi w postaci płynnych preparatów lub tabletek [121]. W 1923 r. w Tbilisi, stolicy Gruzji, George Eliava i Felix d'Herelle założyli instytut George Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology. Instytut ten od wielu dekad prężnie działa w kierunku opracowywania i produkowania terapeutyków opartych na fagach, a ponadto do dziś produkuje się w nim dwa główne koktajle fagowe, Pyophage i Intestiphage, przywiezione przez d'Herelle z Paryża w 1930 roku.

W ostatnich latach terapie fagowe weszły do fazy badań klinicznych, np. w leczeniu infekcji ucha wewnętrznego [192], tyfusu [171], czy infekcjach ran oparzeniowych (projekt "Phagoburn") [89]. Do tej pory kilka fagowych produktów terapeutycznych przeszło do fazy I lub II prób klinicznych [105]. W 2019 r. Food and Drug Administration (FDA) zatwierdziła pierwsze w USA badanie kliniczne dotyczące dożylnej terapii fagowej [186]. W literaturze dostępnych jest niezmiernie dużo danych potwierdzających skuteczność terapii fagowej na przestrzeni wielu lat. Również Polska może poszczycić się osiągnięciami w tej dziedzinie. Od 1952 r. we Wrocławiu działa Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk. Jest to jedyny w Unii Europejskiej ośrodek zajmujący się eksperymentalną terapią fagową. Instytut Hirszfelda utworzył w 2005 roku Ośrodek Terapii Fagowej, w którym pacjenci są kwalifikowani do eksperymentalnej terapii fagowej, następnie leczeni oraz monitorowani po zakończeniu terapii. Na dzień dzisiejszy forma eksperymentalna jest jedyną dostępną formą tego rodzaju leczenia ze względu na brak dostępności wyników standardowych badań klinicznych preparatów fagowych. Instytut dysponuje bardzo dużą kolekcją fagów, które mogą być stosowane w zakażeniach wywołanych przez następujące rodzaje bakterii: *Staphylococcus, Enterococcus, Pseudomonas, Escherichia, Klebsiella, Serratia, Proteus, Acinetobacter, Citrobacter, Enterobacter, Stenotrophomonas, Shigella, Salmonella, Burkholderia* i *Morganella*. Jak podaje Instytut, wskazania do terapii fagowej obejmują objawowe zakażenia bakteryjne skóry lub tkanki podskórnej, kości i szpiku, stawów, przetok, ran i odleżyn, dróg moczowych lub rodnych (w tym prostaty), przewodu pokarmowego, ucha środkowego, zatok, migdałków, górnych lub dolnych dróg oddechowych (https://hirszfeld.pl/struktura/centrum-medyczne/osrodek-terapii-fagowej/zasady-terapii-

fagowej/). Już w latach 1987-1999 fagoterapię zastosowano tam u ponad 1300 pacjentów z różnymi zakażeniami bakteryjnymi wywołanymi przez wielooporne szczepy z rodzajów: *Staphylococcus, Klebsiella, Escherichia, Proteus, Pseudomonas* i *Enterobacter*. W przypadku 86% chorych uzyskano całkowite wyleczenie według zastosowanych wtedy kryteriów [124]. Bardzo dobre wyniki, czyli co najmniej 90% skuteczność uzyskano w leczeniu wielu typów schorzeń, np.: zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych, zapaleniu kości i szpiku, zapaleniach kości po złamaniu, zakażeniach układu moczowego, czy ropniach skóry [124].

Do terapii fagowej kwalifikowane są jedynie fagi lityczne. Integracja DNA fagów lizogennych z genomami bakterii stwarza zagrożenie dla przenoszenia potencjalnie szkodliwych genów (np. genów kodujących toksyny lub genów antybiotykooporności) między szczepami [183]. Dawka podawanych preparatów ma wielorakie znaczenie w powodzeniu terapii. Zwiększanie dawki może przedłużać utrzymywanie się fagów w organizmie chorego, które zwykle są szybko wychwytywane i eliminowane z organizmu za pomocą komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby i śledziony [124]. Ponadto dobór skutecznych dawek może być również pomocny w kontrolowaniu odpowiedzi immunologicznej na faga [62]. Pojawianie się przeciwciał specyficznych dla fagów obserwowano wielokrotnie zarówno u zwierząt, jak i ludzi. Obserwacje z fagoterapii u ludzi pokazują jednak, że przeciwciała niekoniecznie utrudniają przebieg leczenia [62].

Koewolucja fagów i ich gospodarzy bakteryjnych doprowadziła do pojawienia się kilku potencjalnych utrudnień w stosowaniu naturalnych fagów jako środków terapeutycznych. Można wymienić tu ograniczony zakres gospodarza (w zależności od przypadku może to być zaleta lub wada), umiarkowaną skuteczność przeciwbakteryjną i pojawianie się odporności na fagi [122]. Wreszcie bardzo ważne jest zapewnienie, aby przygotowywane preparaty fagowe były wolne od bakterii i toksyn bakteryjnych, co zwiększa koszty produkcji i stanowi dodatkowe wyzwania techniczne [150]. Ograniczenia pojawiające się w przypadku stosowania fagów do terapii można przezwyciężać wykorzystując najnowsze postępy w biologii syntetycznej i inżynierii genetycznej, aby nadać fagom dodatkowe właściwości terapeutyczne, poprawić ich profile bezpieczeństwa, czy zmienić zakresy gospodarzy [122]. W świetle wspomnianych powyżej ograniczeń czy wymagań, dobrym rozwiązaniem jest również otrzymywanie i stosowanie litycznych enzymów fagowych jako alternatywy dla "klasycznej" terapii fagowej [68].

1.4. Endolizyny fagowe

1.4.1. Ogólna charakterystyka

Endolizyny (lizyny) to kodowane przed dsDNA fagi hydrolazy mureiny, produkowane jako białka późne pod koniec rozwoju litycznego w zainfekowanych fagiem komórkach bakteryjnych. Do momentu rozpoczęcia swojego działania są akumulowane w cytoplazmie. Do mureiny lizyny docierają poprzez kanały w błonie komórkowej bakterii wytworzone przez specjalną grupę innych białek, zwanym holinami, a następnie przecinają wiązania kluczowe dla utrzymania jej struktury. Są zatem bezpośrednio odpowiedzialne za proces uwalniania potomnych wirusów z zainfekowanej bakterii poprzez jej lizę.

1.4.2. Budowa lizyn

Endolizyny cechują się strukturą globularną lub modułową [187]. Lizyny bakterii Gramujemnych są głównie globularne i posiadają jedynie domenę katalityczną [23], podczas gdy lizyny bakterii Gram-dodatnich mają zwykle wielkość 25-40 kDa [52], budowę modułową i wykazują różnorodność w swojej architekturze, która niekiedy wykracza poza klasyczną strukturę dwudomenową większości endolizyn [197]. Wysoce konserwatywna domena Nkońcowa ma aktywność katalityczną i odpowiada za funkcję enzymatyczną. Domena C-końcowa jest zdolna do specyficznego rozpoznawania ligandów (zwykle węglowodanowych) w obrębie ściany bakteryjnej i jest odpowiedzialna za wiązanie cząsteczki lizyny do peptydoglikanu. Liczba domen wiążących różni się w zależności od endolizyn [197], a ponadto domena wiążąca bywa niezbędna dla aktywności katalitycznej. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż powinowactwo wiązania lizyn do elementów ściany bakteryjnej jest tak silne, że można je porównać do wiązania antygen-przeciwciało [114].

1.4.3. Aktywność enzymatyczna lizyn

Endolizyny mogą wykazywać kilka rodzajów aktywności enzymatycznej, przez co dzieli się je na pięć różnych klas w zależności od aktywności katalitycznej ich domeny N-końcowej: 1) transglikozylazy lityczne, 2) endo-β-N-acetyloglukozaminidazy, 3) N-acetylomuramidazy (lizozymy), 4) endopeptydazy i 5) N-acetylomuramylo-L-Ala-amidazy (**Ryc. 4**).



Rycina 4. Schematyczne przedstawienie pięciu rodzajów aktywności enzymatycznej endolizyn fagowych.

Lizyny klas 1-3 rozszczepiają ugrupowania cukrowe, lizyny klasy czwartej ugrupowania peptydowe, a lizyny klasy piątej wiązania peptydowe między tymi dwoma ugrupowaniami. Do najczęściej występujących klas należą amidazy i muramidazy. Wszystkie endolizyny za wyjątkiem transglikolaz, są hydrolazami (**Ryc. 5**) [160].



Rycina 5. Miejsca cięcia peptydoglikanu przez endolizyny o różnej aktywności enzymatycznej (źródło [83], modyfikowane).

1.5. Zastosowanie lizyn

1.5.1. Leczenie infekcji bakteryjnych

Pochodzące z fagów związki przeciwdrobnoustrojowe są z powodzeniem stosowane przeciwko większości infekcji spowodowanych przez bakterie Gram-dodatnie [1]. Ostatnie wyniki badań wykazały skuteczność lizyn fagowych przeciwko *S. aureus* użytych w eksperymentach na zwierzętach oraz w przypadkach klinicznych u ludzi. Co ciekawe, endolizyny fagowe są obecnie stosowane w różnych badaniach klinicznych na ludziach. Przykładem są lizyny SAL200 i CF-301, które z powodzeniem stosowano przeciwko *Staphylococcus aureus* w leczeniu infekcji krwi i serca. Lizyna SAL200 jest kandydatem na nowy lek do walki z opornymi na antybiotyki zakażeniami gronkowcowymi. W badaniu

klinicznym opisanym przez Jun i wsp. [92] oceniano farmakokinetykę, farmakodynamikę i tolerancję wśród zdrowych ochotników płci męskiej po podaniu dożylnym pojedynczych rosnących dawek SAL200. Preparat był dobrze tolerowany i nie zaobserwowano żadnych poważnych efektów niepożądanych (AE – od ang. *adverse effects*). Większość AE była łagodna. Opisane prace badawcze stanowiły pierwsze u ludzi badanie I fazy leku na bazie endolizyny fagowej podawanego dożylnie. Innym przykładem zastosowania są dostępne na rynku rekombinowane endolizyny, Staphefekt SA.100 i Staphefekt XDR.300, produkowane przez holenderską firmę Micreos Human Health BV, które zostały użyte w leczeniu pacjentów z przewlekłą chorobą skóry wywołaną przez *S. aureus* [75]. Staphefekt SA.100 to rekombinowana lizyna do miejscowego stosowania na skórę, aktywna przeciwko metycylinowrażliwym, jak i opornym szczepom *S. aureus*. Jej podanie zakończyło się powodzeniem w leczeniu trzech pacjentów cierpiących, mimo antybiotykoterapii, na nawracające dermatozy [176].

W 2014 roku Briers wraz z zespołem z powodzeniem określił aktywność nowej endolizyny LoGT-008 wobec *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* odpowiedzialnych za infekcje skóry [18]. Opracowany model ludzkiej linii komórek keratynowych naskórka noworodka poddano działaniu *P. aeruginosa*, a następnie podano artylizynę (*artilysin* – modyfikowana endolizyna) LoGT-008 i lizynę PVP-SE1gp146. Wyniki wykazały, że oba związki mogą chronić ludzką linię komórkową (100%) przed infekcjami *P. aeruginosa* i zmniejszać liczbę bakterii [18].

1.5.2. Zwalczanie biofilmów

Poza leczeniem zakażeń bakteryjnych u ludzi, lizyny mogą być również stosowane w kontroli patogenów w żywności i karmach dla zwierząt oraz w usuwaniu biofilmów [1]. Infekcje związane z obecnością biofilmu są często chroniczne i trudne do leczenia, stąd badania nad ich eliminacją są szeroko opisywane w literaturze. Pierwsze doniesienie o użyciu lizyny fagowej do eliminowania biofilmu *S. aureus* pochodzi już z 2007 roku [158]. Rekombinowana endolizyna Phi11 hydrolizowała inaktywowane termicznie gronkowce, jak i biofilmy utworzone przez nie na sztucznych powierzchniach. Biofilmy gronkowcowe stanowią poważny problem zarówno w szpitalach, jak i w przemyśle spożywczym. Lizyna LysH5 zabijała komórki bakteryjne w biofilmach wytwarzanych przez kliniczne szczepy MRSA (metycylinooporny *S. aureus*) oraz *Staphylococcus epidermidis*, czego dowodziła redukcja CFU (od ang. *colony-forming unit*) [74]. Innym przykładem jest zwalczanie biofilmu *Streptococcus pneumoniae*. Antypneumokokowe właściwości różnych hydrolaz ściany komórkowej produkowanych przez

ten szczep oraz infekujące go fagi były testowane na modelach biofilmu *in vitro* [42]. Główna pneumokokowa autolizyna LytA, amidaza, wykazała największą skuteczność w "rozkładaniu" biofilmów *S. pneumoniae*. Bardzo skuteczne były również kodowane przez fagi lizozymy Cpl-1 i Cpl-7. Dla lizyn LytA i Cpl-1 odnotowano synergistyczne działanie w zwalczaniu biofilmów *S. pneumoniae* już po kilku godzinach.

1.5.3. Kontrola patogenów w żywności

Głównym problemem w przemyśle spożywczym jest zanieczyszczenie patogenami przenoszonymi przez żywność. Zanieczyszczenie szczepami S. aureus, Salmonella spp., Escherichia coli, Listeria monocytogenes i Clostridium spp. może zagrażać zdrowiu ludzi, powodując straty finansowe podczas przetwarzania żywności. Endolizyny zostały zasugerowane jako możliwy alternatywny środek biokontroli. Co więcej, w ostatnich latach zostały już one w tej gałęzi przemysłu wielokrotnie wykorzystane. Oczyszczone endolizyny można dodawać bezpośrednio do żywności. Ponadto mogą być one wytwarzane i wydzielane przez fermentujące bakterie, takie jak Lactococcus lactis lub Lactobacillus spp. [30]. Endolizynę PlyP100 z faga Listeria badano w procesie produkcji sera typu hiszpańskiego, w której często dochodzi do zakażeń tym patogenem. Lizyna wykazywała silny bakteriostatyczny efekt oraz zachowywała stabilność przez cztery tygodnie [87]. Gatunki Clostridioides wywołują choroby drobiu oraz są przyczyną psucia się żywności. Kiełkujące spory C. sporogenes i C. tyrobutyricum przyczyniają się do powstawania gazów i kwasów w przemyśle mleczarskim, co zmienia strukturalne i sensoryczne właściwości serów. Mayer i wsp. wyizolowali amidazę CS74L z faga C. sporogenes i udokumentowali, że oczyszczone białko całkowicie lizowało komórki C. sporogenes po zastosowaniu egzogennym. Było również aktywne w stosunku do szczepów C. tyrobutyricum i C. acetobutylicum [120]. Działanie bakteriobójcze lizyny LysSA11 z faga S. aureus wykazano w żywności i na naczyniach sztucznie skażonych MRSA. Lizyna szybko zabijała bakterie w zakażonym mleku lub na szynce, zarówno w temperaturze chłodniczej, jak i pokojowej [31].

1.5.4. Kontrola zakażeń w rolnictwie

Bakterie fitopatogenne są przyczyną wielu problemów związanych z bezpieczeństwem żywności na całym świecie. Stosowanie antybiotyków w rolnictwie jest bardzo kontrowersyjne, ponieważ nie jest jasne, w jakim stopniu przyczyniają się one do rozwoju antybiotykooporności u ludzkich patogenów [29, 110]. Stosowanie lizyn jest proponowane jako metoda ochrony i walki z zakażeniami roślin. Jedną z proponowanych strategii jest produkcja roślin transgenicznych, w których zachodzi ekspresja endolizyn w celu zapewnienia ochrony przed bakteriami

chorobotwórczymi. Po rozbiciu komórek roślinnych przez pektynazy bakteryjne, endolizyny gromadzą się w tkance i inaktywują bakterie. Transgeniczne rośliny pomidora z endolizynami faga CMP1 zostały pomyślnie opracowane już dwie dekady temu, aby zapobiec infekcji *Clavibacter michiganensis*, bakterii wywołującej bakteryjnego raka tych roślin [78].

Inne możliwe aplikacje lizyn to dezynfekcja szpitali, domów opieki zdrowotnej, zakładów przetwórstwa spożywczego, czy gospodarstw rolnych [83].

1.6. Zalety i wady stosowania lizyn

Do zalet stosowania lizyn można zaliczyć następujące ich właściwości:

- endolizyny uważa się za bezpieczniejsze w stosowaniu niż fagi (z racji braku wprowadzania obcego DNA do organizmu ludzkiego);
- brak samoreplikacji lizyn w porównaniu do fagów pozwala na ich precyzyjne dozowanie;
- specyficzne i szybkie działanie;
- przeciwciała nie hamują działania lizyn [83];
- możliwość stosowania w różnych środowiskach, np. u ludzi, zwierząt, do zwalczania biofilmów, czy w przemyśle spożywczym;
- wysoka czystość preparatów;
- białkowy charakter lizyn pozwala na dokonywanie modyfikacji genetycznych, które mogą usprawniać ich działanie [150];
- brak wykształcania mechanizmu oporności na lizyny przez bakterie [9, 67];
- możliwość użycia lizyn z fagów litycznych i łagodnych;
- ich aktywność jest niezależna od oporności bakterii na antybiotyki;
- możliwość lizy bakterii po zastosowaniu lizyny zewnętrznie względem komórki bakteryjnej (szczególnie wobec bakterii Gram-dodatnich);
- lizyny mogą być zastosowane zarówno jako profilaktyka, jak i w ramach leczenia.

Do wad stosowania lizyn można zaliczyć:

- białko może ulec degradacji w przewodzie pokarmowym i wcześniejszej inaktywacji [130];
- brak samoreplikacji lek sam się nie mnoży tak, jak w przypadku fagów;
- lizyny, jak wszystkie białka, wywołują odpowiedź immunologiczną. Dowiedziono jednak, że połączenie lizyn z glikolem polietylenowym (PEG) może zmniejszać ich immunogenność poprzez redukcję wiązania przeciwciał. Stwierdzono jednocześnie, że może to z kolei zmniejszać aktywność bakteriobójczą, jednak problem ten jest kompensowany przez znacznie polepszoną farmakokinetykę. Jako że powinowactwo przeciwciał do antygenów

jest porównywalne z powinowactwem lizyn do patogenów, aktywność lizyn może być jedynie spowolniona, ale nie zahamowana [83];

• powodzenie leczenia głównie w przypadku bakterii Gram-dodatnich – problemy z aplikacją przeciwko bakteriom Gram-ujemnym ze względu na obecność błony zewnętrznej. Są badane i opracowywane trzy drogi obejścia tego problemu: zastosowanie lizyn mających właściwości umożliwiające pokonanie bariery błony zewnętrznej dzięki dodatnio naładowanemu C-końcowi, który ją destabilizuje, inżynieria białek, aby wyposażyć lizynę w niezbędne narzędzia do pokonania błony zewnętrznej oraz użycie fizycznych lub chemicznych środków do zakłócania zewnętrznej integralności błony [73]. Przykładem ostatniego rozwiązania jest zastosowanie EDTA, środka chelatującego, który usuwa dwuwartościowe kationy stabilizujące zewnętrzną błonę z ich miejsca wiązania, rozrywając ją i pozostawiając podatną na atak lizyny [130].

1.7. Fagi i lizyny B. anthracis

Pierwszego faga specyficznego dla B. anthracis wyizolowano w 1930 r. z nieoczyszczonych ścieków [37]. Od tego czasu wyizolowano kilka dodatkowych fagów B. anthracis, w tym dobrze znanego i scharakteryzowanego faga Gamma [19], który stanowi narzędzie diagnostyczne do odróżniania B. anthracis od innych członków grupy B. cereus [111]. W wyniku niestabilności genetycznej i powszechnego stosowania fagów Gamma istnieje obecnie kilka podobnych, ale genetycznie odmiennych fagów Gamma-podobnych, np. łagodny fag Wbeta i zjadliwe fagi Fah, LSU, USAMRIID i Cherry [64, 162]. Fag Fah był szeroko stosowany w byłym Związku Radzieckim do identyfikacji bakterii wąglika [126]. W 1963 Dong i wsp. wyizolowali innego faga B. anthracis z nieoczyszczonych ścieków i oznaczyli go jako AP631, wskazując, że był to pierwszy fag wąglikowy wyizolowany w Chinach [43]. Ponieważ AP631 może specyficznie infekować nieotoczkowe szczepy wąglikowe i tworzyć klarowne łysinki, jest obecnie szeroko stosowany w Chinach do identyfikacji tych bakterii. Mimo jego dużej specyficzności gatunkowej, Zhang i wsp. odkryli w 2016 r., że fag ten niespecyficznie lizował również kilka izolatów B. cereus z ich laboratorium, tworząc mętne łysinki [85]. W 2018 r. izraelscy badacze wyizolowali kolejne trzy fagi specyficzne wobec laseczki waglika: Carmel SA, Tavor SA i Negev SA. Sekwencje ich genomów zostały opublikowane w bazie GenBank, jednak nie zostały one scharakteryzowane, jak też nie są dostępne informacje o szczegółach biologii tych fagów [6].

Wyizolowane dotychczas fagi infekujące przedstawicieli grupy *B. cereus* wykazują różnorodność morfologii i zakresu gospodarza. Były one klasyfikowane do rodzin *Siphoviridae*

(np.: Gamma, Fah, Carmel_SA, Wbeta, Wip2), *Myoviridae* (np.: Wip5, Frp1, Crookii) lub *Tectiviridae* (np.: Wip1 and Htp1) [77, 163]. Obecnie większość opisywanych fagów wąglikowych to ogonkowe siphowirusy. Część z nich poza szczepami *B. anthracis* infekuje również niektóre lub rzadkie szczepy *B. cereus*. Co więcej, według Fouts'a i wsp. fag Gamma, Cherry i Fah wywodzą się zasadniczo z tego samego faga, który nabył zmiany w trzech różnych miejscach w genomie [55].

Poza odkryciem puli różnych fagów *B. anthracis* wiele uwagi poświęca się także kodowanym przez nie endolizynom. Badania nad fagiem Gamma dały początek scharakteryzowaniu najbardziej znanej lizyny o potwierdzonej specyficzności i skuteczności wobec szczepów wąglikowych, tj. amidazy PlyG. Dowiedziono, że specyficznie zabija ona zarówno komórki wegetatywne laseczki wąglika, jak i kiełkujące endospory jej izolatów i innych przedstawicieli "klastra" *B. anthracis* [164]. Inna lizyna, PlyPH o przypuszczalnie fagowym pochodzeniu znaleziona w genomie *B. anthracis*, ma wysoki stopień identyczności sekwencji domniemanej domeny C-końcowej z PlyG, ale prawdopodobnie inne działanie katalityczne [194]. Obydwa enzymy mają identyczny zakres aktywności, co może sugerować, że mogą rozpoznawać i wiązać ten sam epitop ściany komórkowej [195]. Kolejnym przykładem jest lizyna PlyB wyizolowana z łagodnego faga *B. cereus sensu lato*, BcpI. PlyB wykazała silne działanie bakteriobójcze przeciwko wszystkim badanym środowiskowym, laboratoryjnym i klinicznym izolatom *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* i *B. mycoides* [145]. PlyB należy do grupy lizozymów, ma zatem inny niż PlyG mechanizm działania.

W niniejszej pracy scharakteryzowano trzy nowe wyizolowane fagi specyficzne wobec *B. anthracis*, jak również zbadano aktywność lityczną endolizyn dwóch z nich, otrzymanych w postaci oczyszczonych białek.

2. CELE PRACY

- Izolacja i charakterystyka nowych bakteriofagów specyficznych wobec laseczki wąglika
 - biologiczna charakterystyka fagów
 - genomowa charakterystyka fagów
- Otrzymanie kodowanych przez nowe bakteriofagi białek o aktywności litycznej (endolizyn)
 - klonowanie wybranych genów kodujących białka lityczne
 - zbadanie aktywności litycznej w warunkach *in vitro* wobec szczepów
 B. anthracis oraz innych przedstawicieli grupy *Bacillus cereus*.

Nowe fagi i białka enzymatyczne zdolne do lizy komórek laseczki wąglika mogłyby potencjalnie mieć znaczenie terapeutyczne (alternatywa lub uzupełnienie antybiotykoterapii) w leczeniu infekcji wywoływanych przez *B. anthracis*.

3. ZADANIA BADAWCZE

- Izolacja i charakterystyka nowych bakteriofagów specyficznych wobec *B. anthracis* (m. in. morfologia, plon faga).
- 2. Sekwencjonowanie genomów wybranych fagów i identyfikacja genów kodujących ich endolizyny.
- 3. Analiza porównawcza genomów nowych fagów i sekwencji zidentyfikowanych lizyn względem podobnych znanych fagów i ich enzymów litycznych.
- 4. Klonowanie genów kodujących endolizyny badanych fagów i ich ekspresja w komórkach *E. coli* celem otrzymania oczyszczonych białek.
- 5. Badanie aktywności biologicznej otrzymanych endolizyn.

4. MATERIAŁY

4.1. Szczepy bakteryjne

Pełna lista szczepów bakteryjnych użytych w badaniach znajduje się w **Tabeli 2**. Szczepy posłużyły do określenia zakresu gospodarza fagów oraz endolizyn i obejmują bakterie z grupy *Bacillus cereus* oraz szczep *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Na liście znajdują się szczepy przejściowe z grupy *B. cereus* (*B. cereus* i/lub *B. thuringiensis*), które nie posiadają plazmidów, ale posiadają chromosomalny gen markerowy laseczki wąglika – Ba 813 [135]. Ich pochodzenie nie zostało potwierdzone, jednak przypuszcza się, iż mogły pochodzić od *B. anthracis* [136]. Bezotoczkowy izolat szczepionkowy *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 stosowany był jako szczep gospodarza we wszystkich doświadczeniach. Do hodowli używano podłoża TSB, TSA oraz agaru Columbia z krwią.

Gatunek (liczba)	Szczep	Pochodzenie szczepu	Uwagi
B. cereus (11)	ATCC 10872	Kolekcja WIHE	
	ATCC 10876	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	ATCC 11778	Kolekcja WIHE	
	ATCC 13472	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	ATCC 14579 ^T	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	ATCC 19637	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	ATCC 23261	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	F16959	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	F17202	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	F17289	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	UW85	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
B. thuringiensis	ATCC 33679	Kolekcja WIHE	
(11)	ATCC 35646	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	ATCC 10792	Kolekcja WIHE	
	ATCC 10792 ^T	Kolekcja WIHE	
	T07-019	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	T07-128	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	T07-146	Kolekcja WIHE	
	T07-151	Kolekcja WIHE	
	T07-155	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	T07-202	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	#35	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
B. anthracis	34F2	Szczepionka "Antraphyl" firmy Phylaxia-Sanofi	Numer seryjny 0210E2
(6)	211	Zakład Higieny Weterynaryjnej w Białymstoku, Oddział Łomża	Wyizolowany ze śledziony krowy padłej na wąglik
	1153	Kolekcja WIHE	Wyizolowany z padłej krowy

Tabela 2. Lista szczepów bakteryjnych użytych w badaniach.

	1583	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	Klon szczepu 211
	1584	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	PZH	Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy	
B. mycoides	ATCC 6462	Kolekcja WIHE	
(3)	ATCC 21929	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	K184	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
<i>B.</i> sp. <i>Ba</i> 813+ (10)	#6 (I/2)	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	#7 (II/3)	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	#12 (\$8553/2)	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	#16 (PJ572)	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	#17 (094)	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	#21 (T1197-77)	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	#28 (3)	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	#30 (1B)	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	#31	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
	#3403	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	
B. subtilis	ATCC 6633	Uniwersytet w Scranton, Pensylwania, USA	

4.2. Podłoża mikrobiologiczne

4.2.1. Agar tryptonowo-sojowy TSA (pH 7,3)

trypton	15 g
pepton sojowy	5 g
NaCl	5 g
agar	15 g
woda destylowana	do 1000 ml

4.2.2. Bulion tryptonowo-sojowy TSB (pH 7,3)

trypton	17 g
pepton sojowy	3 g
NaCl	5 g
K2HPO4	2,5 g
glukoza	2,5 g
woda destylowana	do 1000 ml

4.2.3. Bulion LB (pH 7,0)

trypton	10 g
ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	5 g
woda destylowana	do 1000 ml

4.2.4. Agar LA (1,5%) (pH 7,0)

trypton	10 g
ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	5 g
agar	15 g
woda destylowana	do 1000 ml

4.2.5. Agar półpłynny (0,7%)

trypton	15 g
pepton sojowy	5 g
NaCl	5 g
agar	7 g
woda destylowana	do 1000 ml

4.2.6. Agar COLUMBIA z krwią (pH 7,3)

trypton	12 g
pepton sojowy	5 g
ekstrakt drożdżowy	3 g
ekstrakt wołowy	3 g
skrobia kukurydziana	1 g
NaCl	5 g
agar	13,5 g
kolistyna	10 g
kwas nalidyksowy	10 g
krew owcza bez włóknika	5%
woda destylowana	do 1000 ml

4.2.7. Pożywka SOC (pH 6,8-7,0)

trypton	20 g
ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	0,584 g
KCl	0,186 g
MgCl ₂	0,952 g
MgSO ₄	1,024 g
sterylna glukoza	3,6 g
woda destylowana	do 1000 ml

Pożywkę SOC sterylizowano przed dodaniem glukozy, aby uniknąć reagowania glukozy z aminokwasami podczas ogrzewania.

Przygotowane podłoża sterylizowano w autoklawie pod ciśnieniem 1 atm. w temp. 121 °C przez 15 minut. Odpowiednie pH ustalano za pomocą 1 M NaOH lub 35-38% HCl.

4.3. Bufory i roztwory

4.3.1. Bufor TM

50 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 mM MgSO₄ uzup. wodą

Otrzymany roztwór przepuszczano przez filtr 0,22 µm.

4.3.2. Bufory i roztwory do elektroforezy agarozowej

4.3.2.1. Bufor TBE 5x do elektroforezy (pH 8,2-8,4)

445 mM Tris base 445 mM kwas borowy 10 mM EDTA uzup. wodą

4.3.2.2. Bufor obciążający 6x (bufor próbkowy)

10 mM Tris-HCl, pH 7,6 0,03% błękit bromofenolowy 0,03% xylene cyanol FF 60% glicerol 60 mM EDTA uzup. wodą

4.3.2.3. Bromek etydyny o stęż. 10 mg/ml

4.3.3. Bufory i roztwory do elektroforezy poliakrylamidowej SDS-PAGE

4.3.3.1. Żel górny (zagęszczający) – 2 ml/dwa żele

30% akrylamid	330 µl
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	250 µl
10% SDS	20 µl
10% AMPS	20 µl

woda	1,4 ml
TEMED	2 µl

4.3.3.2. Żel dolny 12% (rozdzielający) - 10 ml/dwa żele

30% akrylamid	4 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml
10% SDS	100 µl
10% AMPS	100 µl
woda	3,3 ml
TEMED	4 µl

4.3.3.3. AMPS 10%

AMPS	50 mg
woda	500 µl

Roztwór AMPS sporządzano na świeżo przed przygotowywaniem żelu.

4.3.3.4. Bufor do elektroforezy białek 5x (pH 8,3)

250 mM Tris-HCl, pH 8,1-8,3
1,92 M glicyna
1% SDS
uzup. wodą

4.3.3.5. Bufor obciążający z β -merkaptoetanolem 4x (bufor próbkowy)

50 mM Tris-HCl, pH 6,8 2% SDS 10% glicerol 1% β-merkaptoetanol 12,5 mM EDTA 0,02% błękit bromofenolowy uzup. wodą

Bufor mieszano z próbką białkową w stosunku 1:3.

4.3.3.6. Bufor obciążający nieredukujący Laemmli 2x

65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8 2% SDS 26,3% glicerol
0,01% błękit bromofenolowy uzup. wodą

Bufor mieszano z próbką białkową w stosunku 1:1.

4.3.3.7. Bufor do barwienia żeli – Coomassie Brilliant Blue

CBB G-250	100 mg
metanol	45 ml
kwas octowy	10 ml
woda	do 100 ml

4.3.3.8. Bufor do odbarwiania żeli

metanol	100 ml
kwas octowy	100 ml
woda	do 1000 m

4.3.4. Bufory do elektroforezy w polu pulsacyjnym PFGE

4.3.4.1. Bufor PL

50 mM Tris-HCl, pH 7,5 50 mM EDTA 1% SDS uzup. wodą

4.3.4.2. Bufor TE

10 mM Tris-HCl, pH 7,9-8,0 1 mM EDTA uzup. wodą

4.3.5. Antybiotyki

4.3.5.1. Kanamycyna 10 mg/ml

kanamycyna	150 mg
woda	do 15 ml

Otrzymany roztwór przepuszczano przez filtr 0,22 μ m, rozporcjowywano po 1 ml i przechowywano w temp. -20 °C.

4.3.5.2. Ampicylina 50 mg/ml

ampicylina	750 mg
woda	do 15 ml

Otrzymany roztwór przepuszczano przez filtr 0,22 μ m, rozporcjowywano po 1 ml i przechowywano w temp. -20 °C.

4.3.6. Bufor do dializy

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
200 mM NaCl
5% glicerol
uzup. wodą

4.3.7. PMSF 200 mM

PMSF (inhibitor proteinazy serynowej) nie rozpuszcza się w wodzie i jest niestabilny w roztworach wodnych. Roztwór przygotowywano w izopropanolu, ew. w etanolu lub metanolu i dodawano do innych roztworów na świeżo.

PMSF	0,175 g
izopropanol	do 5 ml

4.3.8. Bufory i roztwory do indukcji i oczyszczania białek w warunkach natywnych

4.3.8.1. IPTG 100 mM

IPTG	0,119 g
woda	do 5 ml

Otrzymany roztwór przepuszczano przez filtr 0,22 µm i przechowywano w temp. -20 °C.

4.3.8.2. Bufor do sonikacji (pH 8,0)

20 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,1% Triton X-100 500 mM NaCl 1 mM PMSF uzup. wodą

4.3.8.3. Bufor lizujący – wiążący (pH 8,0)

20 mM Tris-HCl, pH 8,0 300 mM NaCl 10 mM imidazol

uzup. wodą

4.3.8.4. Bufor płuczący (pH 8,0)

20 mM Tris-HCl, pH 8,0 300 mM NaCl 25 mM imidazol uzup. wodą

4.3.8.5. Bufor elucyjny (pH 8,0)

20 mM Tris-HCl, pH 8,0 300 mM NaCl 250 mM imidazol uzup. wodą

4.3.8.6. Bufor MES (pH 5,0)

20 mM MES sodium salt 100 mM NaCl uzup. wodą

4.3.9. Bufory do specyficznej detekcji białek metodą Western Blotting

4.3.9.1. Bufor do blottingu (pH 8,1-8,3)

25 mM Tris-HCl, pH 8,0 190 mM glicyna 20% metanol uzup. wodą

4.3.9.2. Bufor TBS 10x (pH 7,4-7,6)

20 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl uzup. wodą

4.3.9.3. Bufor TBST (pH 7,4-7,6)

20 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1% Tween-20 uzup. wodą

4.3.9.4. Bufor TBST z mlekiem

TBST

5% mleko odtłuszczone

4.3.10. Bufor do renaturacji

50 mM Tris-HCl, pH 7,4 1% Triton X-100 uzup. wodą

5. METODY

5.1. Poszukiwanie nowych bakteriofagów specyficznych wobec laseczki wąglika oraz ich charakterystyka

5.1.1. Metoda płytek dwuwarstwowych

W badaniach mikrobiologicznych wykorzystywano płytki dwuwarstwowe. Na spodnią warstwę podłoża TSA (o 1,5% zawartości agaru) - 15 ml - wylewano 3 ml warstwę tzw. agaru półpłynnego (o 0,7% zawartości agaru) zawierającego 70 µl szczepu bakteryjnego z całonocnej hodowli. Agar półpłynny pozwala na lepszą dystrybucję mikroorganizmów przed zastygnięciem, dzięki czemu po nocnej inkubacji uzyskiwano na płytkach regularną murawkę bakteryjną.

5.1.2. Izolacja bakteriofagów z próbek środowiskowych

Bakteriofagi izolowano z próbek środowiskowych, m.in. gleby i obornika, pobranych w różnych rejonach Polski i Ukrainy. Próbki środowiskowe (~10 g) uzupełniano pożywką TSB z MgSO₄ (0,2%) do 35 ml, a następnie inkubowano przez noc w 37 °C z dodatkiem 100 μl całonocnej hodowli szczepu gospodarza *B. anthracis* 34F2. Następnego dnia próbki traktowano 0,5 ml chloroformu, umieszczano na wytrząsarce na 30 min. i wirowano przez 30 min. przy 4200x g. Supernatant filtrowano za pomocą filtra strzykawkowego PES 0,22 μm (Millipore, Merck Millipore, Burlington, MA, USA), po czym 15 μl przesączu nakraplano na murawkę *B. anthracis* na płytce dwuwarstwowej i inkubowano przez noc w 37 °C.

5.1.3. Oczyszczanie bakteriofagów oraz określenie ich zakresu gospodarza

Po 24-godzinnej inkubacji przejrzyste łysinki fagowe otrzymane na murawce szczepu gospodarza wycinano za pomocą szklanych pipet pasterowskich, zawieszano w 1 ml buforu TM (50 mM Tris-Cl, 10 mM MgSO₄, pH 7,5), energicznie worteksowano i wysiewano na płytki dwuwarstwowe. Czynności te powtarzano jeszcze co najmniej dwa razy, aby uzyskać czysty klon pojedynczego faga.

W celu określenia zakresu gospodarza faga, 10-15 µl nierozcieńczonych i rozcieńczonych lizatów zawierających danego oczyszczonego faga nakraplano na murawki różnych szczepów bakteryjnych wymienionych w **Tabeli 2** i inkubowano przez noc w 37 °C. Wrażliwość bakterii na fagi oceniano następnego dnia na podstawie obecności stref przejaśnienia lub łysinek.

5.1.4. Mianowanie bakteriofagów

W celu ustalenia liczby cząstek fagowych w 1 ml otrzymanych lizatów przygotowywano dla nich szereg 10-krotnych rozcieńczeń w buforze TM (bufor ten był używany w tym celu we

wszystkich doświadczeniach), po czym po 100 µl kolejnych rozcieńczeń wylewano w trzech powtórzeniach na płytki dwuwarstwowe ze szczepem gospodarza. Na drugi dzień liczono pojedyncze łysinki i obliczano miano fagów uwzględniając współczynnik rozcieńczenia.

5.1.5. Ustalenie optymalnego współczynnika infekcji (MOI) oraz namnażanie bakteriofagów

Ustalenie optymalnego MOI (od ang. *Multiplicity Of Infection*) przeprowadzono w celu znalezienia najlepszego dla procesu namnażania faga stosunku cząstek fagowych do bakterii. Początkowo miana fagów i bakterii doprowadzono do takiej samej wartości, a następnie mieszano je w następujących proporcjach: 1, 0,5, 0,1, 0,05 i 0,01 i inkubowano przez 15 min. w 37 °C. Po inkubacji próbki wirowano (6100x g, 10 min.), a supernatant zawierający niezaabsorbowane fagi odrzucano. Osady zawieszano w 100 µl pożywki LB i inkubowano przez 4 godz. w 37 °C z wytrząsaniem. Zawiesiny wysiewano na dwuwarstwowe płytki Petriego ze szczepem gospodarza i inkubowano przez noc w 37 °C. Doświadczenie wykonano co najmniej trzykrotnie dla każdego faga.

Do namnażania fagów wykorzystywano płytki dwuwarstwowe. Na dolną warstwę podłoża wylewano mieszaninę 50-70 µl nocnej hodowli szczepu *B. anthracis* 34F2 oraz 100 µl nierozcieńczonego lizatu fagowego w 3 ml agaru półpłynnego. Po zastygnięciu i nocnej inkubacji płytek w 37 °C, górną warstwę agaru ze zlizowanymi bakteriami murawki zeskrobywano za pomocą głaszczki do probówki typu falkon o poj. 50 ml. Do falkonów dawano kilkaset mikrolitrów chloroformu w celu zabicia bakterii, a następnie umieszczano je na kołysce laboratoryjnej na ok. 30 min. Zawartość falkonów wirowano przez 30 min. przy 4300x g. Supernatant oczyszczano za pomocą filtra strzykawkowego 0,22 µm i tak otrzymane lizaty mianowano i wykorzystywano do dalszych badań.

5.1.6. Mikroskopia elektronowa

Lizaty zawierające fagi (po 17 ml) ultrawirowano przy 116 200x g przez 2 godz., a osad (niewidoczny) zawieszano w 0,1 M octanie amonu. Zawiesiny ponownie wirowano przy 36 440x g przez 2 godz. w 4 °C, a otrzymany osad zawieszano w 50 µl 0,1 M octanu amonu. Zatężoną zawiesinę fagów (2,5 µl) nanoszono na siatki miedziane z błoną formvarowo-węglową o oczkach 300 x 300 (TAAB Laboratories Equipment Ltd, Berks, England) i pozostawiano na 3 minuty. Nadmiar roztworu usuwano bibułą filtracyjną, po czym siatki wybarwiano negatywnie 2% octanem uranylu przez 2-3 minuty. Po usunięciu nadmiaru roztworu barwiącego siatki suszono przez 15 min. w temperaturze pokojowej. Preparaty oglądano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym JEM 1400 TEM (JEOL Co., Tokyo, Japan) przy powiększeniu 300 000x.

5.1.7. One Step Growth (OSG, jednostopniowy wzrost)

Krzywą OSG wykonano w celu określenia czasu latencji oraz wielkości plonu faga, czyli liczby cząstek potomnych pochodzących z jednego wirionu w jednym cyklu replikacji w komórce gospodarza. Nocną hodowlę *B. anthracis* w pożywce TSB odświeżano poprzez 100-krotne rozcieńczenie i inkubowano z wytrząsaniem w 37 °C, aż gęstość optyczna przy 600 nm osiągnęła 0,5 (około 6,5 x 10⁶ CFU/ml, jak ustalono za pomocą krzywej wzrostu). Porcję hodowli (10 ml) wirowano (3000x g, 10 min., 4 °C), supernatant usuwano, a osad zawieszano w 1 ml pożywki LB. Zawiesinę faga mieszano ze szczepem gospodarza stosując MOI 0,5 i inkubowano w 37 °C przez 20 min, a następnie wirowano przy 5000x g przez 10 min. w 4 °C. Supernatant z wolnymi fagami odrzucano, a osad ponownie zawieszano w 1 ml świeżej pożywki LB. Ten krok powtarzano jeszcze dwukrotnie. Po odwirowaniu osad zawieszano w 25 ml ogrzanej uprzednio do temp. 37 °C pożywki LB i rozpoczynano inkubację w 37 °C z wytrząsaniem (100 obr./min). Co 5-10 min. (wliczając czas zero) z zawiesiny odbierano próbki, wykonywano rozcieńczenia, a następnie wysiewano je na płytki dwuwarstwowe zawierające komórki szczepu 34F2. Doświadczenie wykonano co najmniej trzykrotnie dla każdego faga.

5.1.8. Adsorpcja bakteriofagów do komórek gospodarza

Protokół podobny do opisanego przez Baptista *et al.* [14] został wykorzystany do określenia szybkości adsorpcji fagów do komórek gospodarza. Nocną hodowlę *B. anthracis* odświeżono poprzez 100-krotne rozcieńczenie w pożywce TSB i hodowano w temp. 37 °C z ciągłym wytrząsaniem do uzyskania gęstości optycznej OD₆₀₀ ~0,5. Zawiesinę faga o znanym mianie mieszano z gospodarzem przy MOI 0,5 i worteksowano. Natychmiast po zworteksowaniu pobierano próbkę dla czasu zero i rozcieńczono 10-krotnie poprzez przeniesienie 100 µl do probówki zawierającej 900 µl lodowatej pożywki. Pozostałą mieszanię inkubowano w temp. 30 °C. Próbki do badań pobierano co 5 min. przez maksymalnie 40 min., zawsze po worteksowaniu. Pobierane próbki wirowano przy 12 000x g przez 5 min. Miano niezaabsorbowanych fagów pozostających w supernatancie określano dla każdego punktu czasowego za pomocą płytek dwuwarstwowych z warstwą komórek szczepu gospodarza. Doświadczenie wykonano co najmniej trzykrotnie dla każdego faga.

5.1.9. Badanie wrażliwości bakteriofagów na zmiany pH i temperatury

Stabilność termiczną fagów badano w pięciu różnych temperaturach (20, 37, 50, 60 i 70 °C). Lizaty bakterii zawierające fagi o objętości 1 ml (10⁸ PFU/ml w buforze TM) inkubowano w odpowiednich temperaturach przez 10 min., 30 min., 60 min. i 3 godziny. Pobierane

każdorazowo objętości (100 µl) seryjnie rozcieńczano w buforze TM, a następnie wylewano na płytki dwuwarstwowe z zawiesiną komórek szczepu gospodarza.

Wrażliwość fagów na pH oceniano stosując bufor TM doprowadzony za pomocą NaOH lub HCl do następujących wartości pH: 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 i 13. Lizaty fagowe rozcieńczone w buforze TM do stężenia 10⁸ PFU/ml (500 µl) przenoszono do sterylnych probówek zawierających 4,5 ml buforu TM o różnych wartościach pH. Probówki inkubowano w temp. pokojowej przez 1 godz., następnie zawiesiny seryjnie rozcieńczano i wysiewano na dwuwarstwowe płytki Petriego z zawiesiną komórek szczepu wskaźnikowego. Doświadczenie wykonano co najmniej trzykrotnie dla każdego faga.

5.1.10. Elektroforeza w polu pulsacyjnym (PFGE)

W żelach agarozowych o stałym polu elektrycznym fragmenty DNA o wielkości powyżej wartości granicznej ~30 kb migrują ze stałą szybkością, niezależnie od ich wielkości. Dlatego w celu rozdziału dużych cząsteczek DNA z powodzeniem stosuje się metodę PFGE (od ang. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*), pozwalającą rozdzielać całe genomy. Co ważne, nie jest konieczna wcześniejsza izolacja materiału genetycznego, a do przeprowadzenia elektroforezy można użyć lizatów fagowych.

PFGE przeprowadzano w celu oszacowania wielkości genomów kilku wstępnie wybranych fagów oraz oceny czystości poddawanych analizie preparatów. W tym celu 60 μl lizatów bakteryjnych zawierających fagi ogrzewano do temp. 54 °C i mieszano z 60 μl ogrzanej do tej samej temperatury 2% agarozy (*plug agarose*, CleanCut, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Następnie otrzymaną mieszaninę wlewano do specjalnych kieszonek (*plug molds*) i pozostawiano do zastygnięcia. Zastygnięte bloczki agarozowe inkubowano w 5 ml buforu PL (bufor do lizy fagowej) z 25 μl proteinazy K (stęż. 20 mg/ml) przez noc w temp. 54 °C, z wytrząsaniem. Następnego dnia bloczki trzykrotnie płukano po 15 min. w 5 ml buforu TE ogrzanego do temp. 37 °C i umieszczano w kieszonkach żelu. PFGE przeprowadzono w 1% żelu agarozowym w elektrycznym polu pulsacyjnym, przy napięciu 180 V, gradiencie 6 V/cm z przyrostem 0,1 V/cm, kącie reorientacji cząsteczek DNA 120° i czasie zmiany napięcia 5-80 sekund, przy użyciu systemu CHEF-DR III (Bio-Rad). Rozdział prowadzono w buforze 0,5x TBE przez 16 godzin, w 14 °C. Po elektroforezie żel barwiono bromkiem etydyny (10 mg/ml) przez 30 min., a następnie oglądano pod światłem UV o długości fali 312 nm.

5.1.11. Izolacja oraz pomiar stężenia DNA

Genomowe DNA oczyszczonych fagów izolowano za pomocą zestawu Genomic Mini AX Phage (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) według przepisu podanego przez producenta. W celu zmierzenia stężenia otrzymanego DNA 1 µl preparatu DNA mieszano ze 199 µl odczynnika QuantiFluor® ONE dsDNA Dye i umieszczano we fluorymetrze Quantus (Promega, Madison, WI, USA) do przeprowadzenia pomiaru przy długości fali 504 nm_{Ex}/531 nm_{Em}.

5.1.12. Trawienia restrykcyjne DNA bakteriofagowego

DNA oczyszczonych fagów o znanym stężeniu poddawano działaniu różnych enzymów restrykcyjnych w celu uzyskania wzorów restrykcyjnych. Typowa mieszanina reakcyjna składała się z wody, enzymu restrykcyjnego wraz z odpowiednim buforem oraz DNA fagowego w ilości zależnej od jego stężenia. Trawienia prowadzono przez noc w warunkach zalecanych przez producenta, a na drugi dzień wzór trawień wizualizowano za pomocą elektroforezy agarozowej. Otrzymane wzory porównywano w celu wyeliminowania klonów tego samego faga, zarówno dla nowo izolowanych fagów, jak też pozostałych, nieróżnicowanych do tej pory izolatów fagowych z kolekcji Pracowni Bakteriofagów.

5.1.13. Elektroforeza agarozowa DNA

Próbki DNA mieszano z buforem obciążającym w stosunku 5:1 i nanoszono do studzienek w 1% żelu. Rozdział prowadzono w aparacie Mupid-ONE (ABO, Gdańsk, Polska) początkowo pod napięciem 25 V, a następnie 100 V. Wyniki analizowano za pomocą rejestratora do żeli Quantum-ST4 1100/26MX (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Niemcy) z użyciem programu Quantum Capt, pod światłem UV o długości fali 312 nm.

5.1.14. Sekwencjonowanie DNA bakteriofagów

Sekwencjonowanie całego genomu i wstępne złożenie (oraz wszystkie kolejne reakcje sekwencjonowania w trakcie badań) przeprowadzono w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (IBB PAN) w Warszawie za pomocą sekwenatora MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). Biblioteki fragmentów genomowych skonstruowano używając zestawu Kapa Library Preparation kit (KAPA/Roche), po fragmentacji fagowego DNA przy użyciu nebulizacji. Sekwencje wygenerowane przez NGS zostały przetworzone za pomocą narzędzia cutadapt (https://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200) w celu usunięcia pozostałych adapterów. Dane niskiej jakości usuwano przez filtrowanie z użyciem zestawu

narzędzi FastX (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Przefiltrowane odczyty sekwencji złożóno w kontig przy użyciu programu Newbler v3.0 (Roche, Basel, Switzerland).

5.2. Analiza genomów bakteriofagów oraz porównawcza analiza genomowa z podobnymi bakteriofagami

5.2.1. Adnotacje genomów fagowych

Złożone sekwencje DNA fagów adnotowano automatycznie przy użyciu programu RAST (https://rast.nmpdr.org/) [11]. Adnotacje były korygowane ręcznie na podstawie wyników analizy DNA z wykorzystaniem programów BLASTx, tBLASTn i BLASTp oraz bazy danych NCBI RefSeq.

5.2.2. Ustalenie sekwencji i struktury końców cząsteczek DNA wirionów

Wzory składania odczytów sekwencji genomowych oraz oprogramowanie PhageTerm [61] zostały wykorzystane do przewidywania zakończeń cząsteczek DNA wirionów i mechanizmów pakowania DNA. Aby sprawdzić, czy fagi zawierają jednoniciowe, lepkie końce (sekwencja *cos*), ich DNA traktowano ligazą DNA T4 i stosowano jako matryce do amplifikacji PCR z wykorzystaniem starterów komplementarnych do regionów flankujących miejsca ligacji przewidywanych końców DNA, podobne do opisanych wcześniej przez Foutsa [55] (5'-GGATAAGAATAGATACTATGACC i 5'-TCAACCTGACTAATTCAGCAGC/5'-CGTACCGTGCTAAACTATC. Otrzymane produkty PCR sekwencjonowano.

Dodatkowo przeprowadzono analizę restrykcyjną DNA fagów, aby zwizualizować regiony końcowe. Wzory trawienia były najpierw przewidywane przy użyciu narzędzia SnapGene Simulate Agarose Gel (SnapGene 4.1.9, GSL Biotech LLC, San Diego, CA, USA). Fagowe DNA trawiono wybranymi enzymami restrykcyjnymi przez noc, a następnie część potrawionej próbki ogrzewano do 55 lub 85 °C przez 10 min. i natychmiast ochładzano na lodzie przez 15 minut. Fragmenty DNA z próbek traktowanych termicznie oraz niepoddanych działaniu temperatury rozdzielano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym. DNA faga Lambda zastosowano jako kontrolę pozytywną fagów zawierających sekwencję *cos* na 5' końcu DNA. Sekwencje DNA fagów zostały zreorganizowane zgodnie z ich zidentyfikowanymi początkami.

5.2.3. Analiza sekwencji przewidzianych białek bakteriofagów

Najbliższe homologi białek kodowanych przez przewidywane geny (CDS-y) identyfikowano przy użyciu BLASTp, BLASTx i tBLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Białka przeszukiwano w bazie danych względem bazy wirusów lub bakterii z grupy *B. cereus*, gdy homologi wśród białek bakteriofagowych nie były znajdowane. W przypadku homologów pochodzenia bakteryjnego, serwer PHASTER (https://phaster.ca/) był wykorzystywany do weryfikacji, czy ich geny znajdują się w profagach [8, 200]. Dodatkowo za pomocą narzędzia PHMMER identyfikowano motywy białkowe (https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/phmmer) [146]. Obecność domen transbłonowych białek i sekwencji sygnałowych przewidywano za pomocą, odpowiednio, TMHMM 2.0 i SignalP 5.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/ i https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0) [15, 104]. Wybrane białka dodatkowo analizowano za pomocą HHpred (https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred) w celu znalezienia ich homologów strukturalnych [58, 201].

5.2.4. Analiza filogenetyczna oraz porównawcza genomów bakteriofagowych

Narzędzie BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) zostało użyte do znalezienia bliskich krewnych fagów wśród całkowicie zsekwencjonowanych genomów fagowych zdeponowanych w bazie GenBank, a procent identyczności między nimi obliczono za pomocą programu Viridic (Virus Intergenomic Distance Calculator; [127]). Pokrewieństwo filogenetyczne wyizolowanych fagów z podobnymi fagami określono na podstawie podobieństwa sekwencji w całym genomie obliczonego za pomocą tBLASTx przy użyciu ViPTree (https://www.genome.jp/viptree/) [137], który wykorzystuje oryginalną koncepcję drzewa proteomicznego opracowaną przez Rohwera i Edwardsa [155]. Ponadto pozycja filogenetyczna wyizolowanych fagów wśród fagów blisko spokrewnionych została określona za pomocą BioNumerics v7.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgia) poprzez analizę głównego białka kapsydu (MCP) i białka dużej podjednostki terminazy. Dziesięć najbardziej podobnych genomów fagowych wykorzystano jako genomy referencyjne w dalszych badaniach porównawczych. Liczbę białek rdzeniowych w obrębie poszczególnych kladów fagowych obliczono za pomocą CoreGenes 5.0 (https://coregenes.ngrok.io/) z dwukierunkowym algorytmem najlepszego trafienia i wartością E 1e-05 [34, 180].

Oprogramowanie Geneious Prime w wersji 2021.2.1 (Biomatters, Auckland, Nowa Zelandia) zostało użyte do stworzenia mapy syntenii genomów nowych fagów i ich bliskich krewnych. Dopasowanie wielu sekwencji DNA przeprowadzono przy użyciu programu MAFFT 7.0 [93, 94]. Odpowiednie białka badanych fagów i ich krewnych ponownie analizowano za pomocą BLASTp w celu określenia podobieństwa ich sekwencji aminokwasowych, a wyniki oznaczano kolorami w zależności od procentowej identyczności porównywanych sekwencji białek.

5.3. Otrzymanie kodowanych przez bakteriofagi białek o aktywności litycznej (endolizyn)

5.3.1. Metoda klonowania molekularnego oraz dobór wektora

Do przeprowadzenia klonowania fragmentów DNA wybrano metodę Gibson Assembly (GA) i użyto zestawu do klonowania NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB, Ipswich, MA, USA). Największą zaletą tej metody jest całkowita dowolność miejsca klonowania genu lub genów w wektorze, nieograniczona miejscami restrykcyjnymi oraz długością fragmentów DNA. Dodatkowo reakcja zachodzi bardzo szybko (15 min. w przypadku ligacji 2-3 fragmentów) i jest przeprowadzana w pojedynczej probówce w jednolitej temperaturze. Metoda GA opiera się na utworzeniu w czasie reakcji PCR komplementarnych zakończeń we wstawce (insercie) oraz wektorze, które umożliwiają ich połączenie się. Startery PCR do użycia w GA muszą zawierać dwa elementy sekwencji: sekwencję nakładania się (ang. *overlap*), wymaganą do montażu sąsiednich fragmentów oraz sekwencję specyficzną dla genu lub wektora (**Ryc. 6**). Zalecana optymalna długość regionu *overlap* to 15-25 bp. Prawidłowe dobranie miejsca nakładania się fragmentów oraz poprawne zaprojektowanie starterów jest jednym z kluczowych punktów determinujących powodzenie reakcji klonowania metodą GA.



Rycina 6. Zasada tworzenia regionów komplementarnych dla fragmentów poddawanych ligacji w reakcji Gibson Assembly (źródło - INSTRUCTION MANUAL Gibson Assembly® Master Mix/Gibson Assembly® Cloning Kit, NEB # E2611S/L, #E5510S). Aby uzyskać najlepsze dopasowanie pod względem długości i temperatury topnienia starterów (T_m), sekwencja nakładania się może składać się z nukleotydów należących tylko do jednego fragmentu (*overlap* pokazany na niebiesko) lub może być podzielona między dwa sąsiednie fragmenty w dowolnej kombinacji (*overlap* pokazany na pomarańczowo). Przygotowane fragmenty zawierające regiony komplementarne łączy się z mieszaniną reakcyjną. W mieszaninie Master Mix w tym samym buforze zachodzą trzy osobne reakcje enzymatyczne wymienione poniżej, a efektem reakcji jest kolista cząsteczka dsDNA o pełnej ciągłości.

- Egzonukleaza nadtrawia pojedyncze nici DNA wstawki i wektora tworząc jednoniciowe 3' lepkie końce (*overhangs*), które umożliwiają połączenie się fragmentów komplementarnych na jednym końcu (region *overlap*).
- Polimeraza DNA o wysokiej wierności wypełnia luki w każdym z przyłączonych fragmentów.
 - dd fragments with overlapping ends.
- Ligaza DNA uszczelnia nacięcia w złożonym DNA (**Ryc. 7**).

Rycina 7. Schemat mechanizmu klonowania w reakcji Gibson Assembly (źródło - INSTRUCTION MANUAL Gibson Assembly® Master Mix/Gibson Assembly® Cloning Kit, NEB # E2611S/L, #E5510S).

Jako wektor do klonowania wybrano plazmid pET-30c(+) (**Ryc. 8**). System wektorowy pET jest powszechnie stosowanym systemem do ekspresji genów rekombinowanych białek w *E. coli*. Wektor pET jest obecny w gospodarzu *E. coli* jako plazmid o małej liczbie kopii, co zmniejsza ekspresję genów mogącą zachodzić przed indukcją. Gen będący przedmiotem zainteresowania jest klonowany do wektora pET pod kontrolą silnego systemu regulacji transkrypcji i translacji bakteriofaga T7, czyli promotora T7*lac*. Aktywację ekspresji osiąga się poprzez dostarczenie polimerazy RNA T7 do komórki.

Plazmid pET-30c(+) koduje gen oporności na kanamycynę i antybiotyk ten dodawano do podłóż w dalszych etapach badań z wykorzystaniem tego plazmidu. W kolistym pDNA tego plazmidu występują dwa miejsca kodujące sekwencję kolejno występujących sześciu reszt histydynowych, stanowiących tzw. etykietkę histydynynową, czyli His-tag. Etykietka histydynowa ma kluczowe znaczenie na etapie oczyszczania rekombinowanego białka, co objaśniono w sekcji 5.3.12. W skrócie, umożliwia ona oddzielenie na złożu niklowym interesującego nas białka z mieszaniny białek pochodzących ze zlizowanych komórek bakteryjnych. Zdecydowano się na klonowanie z etykietką His-tag na przeciwległym końcu względem domeny katalitycznej białka kodowanego przez klonowany gen, tj. na C-końcu.



Rycina 8. Mapa plazmidu pET-30a(+) wraz z zaznaczeniem regionów różniących się w wariantach pET-30b(+) i pET-30c(+). Kolorem zielonym zaznaczono położenie regionów DNA kodujących tzw. etykietki histydynowe oraz wskazano położenie regionu wyróżniającego pET-30c(+). Kolorem różowym zaznaczono położenie genu kodującego oporność na antybiotyk (kanamycynę) (źródło – mapa plazmidu Novagen TB095 12/98, po modyfikacjach).

5.3.2. Zaprojektowanie fragmentów do klonowania oraz starterów do reakcji PCR

Sekwencję kodującą etykietkę histydynową oflankowano po obydwu stronach co najmniej trzema innymi resztami nukleotydowymi, zgodnie z zaleceniami producenta zestawu do klonowania. Jako dodatkowy element konstruktu uwzględniony w sekwencji starterów *Reverse* dla wszystkich wstawek, dodano odcinek kodujący elastyczny łącznik w postaci trzech reszt glicyny (Gly, patrz **Tabela 3**) między genem lizyny a sekwencją kodującą His-tag, czyli tzw. linker. Odcinek ten zapewnia większą elastyczność białka fuzyjnego po unieruchomieniu na złożu niklowym w procesie oczyszczania (patrz sekcja 5.3.12.). Sekwencje starterów zaprojektowanych do amplifikacji wstawki oraz wektora wymieniono w **Tabeli 3**. W przypadku amplifikacji wektora pET-30c(+), zaprojektowano parę starterów pasującą do wszystkich trzech konstruktów i obejmującą tylko sekwencję pDNA (**Tabela 3**). Wszystkie reakcje PCR prowadzono z użyciem wiernej polimerazy Q5 z aktywnością korektorską (Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase, NEB), w termocyklerze Bio-Rad (iCyclerTM Thermal Cycler).

Tabela 3. Lista starterów użytych do amplifikacji wstawek oraz wektora do reakcji klonowania. Stylami czcionki zaznaczono fragmenty startera komplementarne do odpowiednich odcinków: **wektor** (pogrubienie), *linker* (kursywa), <u>wstawka</u> (podkreślenie). Parametry dotyczące długości oraz %GC starterów są podane tylko dla odcinków "klejących się", a nie do całej ich sekwencji (dla wstawek - podkreślone fragmenty, dla wektora – pogrubione).

Orientacja startera	Startery dla wstawki – lizyna z faga J5a	Długość (nt)/ %GC
F	GAAGGAGATATACATATGgacagaatattaatcattcccgat	24 nt/33%
R	TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGtcctccccccttcacatacacataggett	20 nt/40%
Orientacja startera	Startery dla wstawki – lizyna z faga F16Ba	Długość (nt)/ %GC
F	GAAGGAGATATACATATGgacagagtattgatcattcccgat	24 nt/42%
R	TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGtcctccccccttcacatacacataggctt	20 nt/40%
Orientacja startera	Startery dla wstawki – lizyna z faga z1a	Długość (nt)/ %GC
F	GAAGGAGATATACATATGgacagagtattgatcattcccgat	24 nt/42%
R	TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGtcctccccccttcacatatacgtaggctt	20 nt/40%
Orientacja startera	Startery dla wektora – plazmid pET-30c(+)	Długość (nt)/ %GC
F	САТАТGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAA	34 nt/24%
R	ggaCACCACCACCACCACCACTGA	21 nt/62%

Aby zapobiec błędom w projektowaniu starterów, przed przeprowadzeniem reakcji PCR wykonano najpierw złożenia fragmentów DNA (tj. poszczególnych wstawek i wektora) *in silico* i utworzono pliki sekwencji końcowych prezentujące obie nici DNA (**Ryc. 9**). Reakcja klonowania została zaprojektowana w taki sposób, aby sekwencja docelowego genu rozpoczynała się od razu po kodonie START należącym do DNA wektora (**Ryc. 9**).



Rycina 9. Symulacja klonowania GA *in silico* w programie SnapGene na przykładzie genu kodującego lizynę z faga J5a klonowanego do plazmidu pET-30c(+). Dolna część obrazu ukazuje początek wklonowanego genu znajdujący się kilka nukleotydów za miejscem wiązania rybosomu (RBS) na dolnej nici DNA plazmidu. Górna część obrazu pokazuje końcowy odcinek wklonowanego genu wraz z dobudowanym do niego fragmentem kodującym etykietkę His-tag (zaznaczony na niebiesko) oraz kodonem STOP (oznaczony czerwonym kwadracikiem). Czerwonymi nawiasami zaznaczono dwa fragmenty stanowiące dla każdej pary starterów wspólny rejon pokrywanych przez nie sekwencji. Środkowy fragment wklonowanego genu nie jest pokazany.

5.3.3. Amplifikacja wektora metodą PCR

Amplifikację wektora do klonowania GA prowadzono według następującego protokołu:

Wstępna denaturacja	98 °C, 30 sek.	
Denaturacja	98 °C, 7 min.	
Przyłączanie starterów	62 °C, 20 sek.	► 30x
Wydłużanie	72 °C, 130 sek.	
Końcowe wydłużanie	72 °C, 120 sek.	

Mieszanina reakcyjna miała następujący skład:

Składniki	Końcowe stężenie	Objętość/50 µl
5x bufor Q5	1x	10 µl
2,5 mM dNTP	200 µM	4 µl
10 μM starter F	0,5 µM	2,5 µl
10 µM starter R	0,5 µM	2,5 µl
polimeraza Q5	0,02 U/µl	0,5 µl
pDNA (0,5 ng/µl)	1 pg-10 ng	1,5 µl
woda jałowa wolna od nukleaz		do 50 µl

W celu zmniejszenia tła matrycy po transformacji, czyli kolonii zawierających pusty plazmid, użyto minimalnej ilości kolistego pDNA jako matrycy (zazwyczaj zalecane jest 0,1–0,5 ng pDNA na 50 µl reakcji PCR). Wystąpienie tła dodatkowo ograniczono poddając

mieszaninę poreakcyjną PCR z plazmidem działaniu enzymu restrykcyjnego DpnI FD (*Fast Digest*) według poniższego protokołu:

- W probówce zmieszano: 7 μl H₂O, 2 μl buforu FD, 10 μl pDNA i 1 μl enzymu DpnI FD (łączna objętość 20 μl).
- 2. Mieszaninę inkubowano 30 min. w 37 °C.
- 3. Enzym inaktywowano inkubując mieszaninę 20 min. w 80 °C.

Enzym DpnI tnie tylko DNA kolistego plazmidu metylowane metylazą Dam, a nie tnie produktu PCR, ponieważ nie jest on metylowany. Wektor z próbek poreakcyjnych, w których stwierdzano obecność dodatkowych, niespecyficznych prążków, oczyszczano z żelu za pomocą zestawu Monarch® DNA Gel Extraction Kit (NEB), według instrukcji producenta.

5.3.4. Amplifikacja wstawki metodą PCR i sekwencjonowanie produktu

Amplifikację wstawek do klonowania GA prowadzono według następującego protokołu:

_	Wstępna denaturacja	98 °C, 30 sek.	
-	Denaturacja	98 °C, 7 min.	
	Przyłączanie starterów	59 °C, 20 sek.	- 30x
	Wydłużanie	72 °C, 25 sek.	
	Końcowe wydłużanie	72 °C, 120 sek.	

Mieszanina reakcyjna miała następujący skład:

Składniki	Końcowe stężenie	Objętość/50 µl
5x bufor Q5	1x	10 µl
2,5 mM dNTP	250 μM	5 µl
10 μM starter F	0,5 µM	2,5 µl
10 μM starter R	0,5 µM	2,5 µl
polimeraza Q5	0,02 U/µl	0,5 µl
DNA φ (10 ng/μl)	1 pg-10 ng	1 µl
woda jałowa wolna od nukleaz		do 50 µl

Jako matryce używano preparaty DNA fagów rozcieńczone do stęż. ok. 10 ng/µl. W celu weryfikacji poprawności sekwencji otrzymanych wstawek, przed etapem ligacji produkty PCR sekwencjonowano z wykorzystaniem następującej pary starterów: J5a sekw F: 5'-GGCTTTGTTAGCAGCCGGAT J5a sekw R: 5'oraz CCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTT. Startery te dopasowano tak, aby były komplementarne do DNA wszystkich fagów wybranych do przeprowadzenia szczegółowych badań (mimo nadanej nazwy). Długość tego odcinka w nienaruszonym DNA fagowym to 277 bp, natomiast przy obecności w jego obrębie wstawionego genu - 1070 bp.

5.3.5. Ligacja fragmentów metodą składania Gibsona (Gibson Assembly)

Ogólny protokół ligacji w reakcji Gibson Assembly przebiega według następujących etapów:

- 1. Zaprojektowanie starterów dla fragmentów (wstawki i wektora) z odpowiednimi wydłużeniami (*overhangs*).
- Powielenie fragmentów za pomocą reakcji PCR z użyciem polimerazy DNA o wysokiej wierności.
- 3. Potwierdzenie czystości fragmentów za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym oraz określenie ich stężenia.
- Zmieszanie na lodzie fragmentów (wstawki i liniowego wektora) z mieszaniną Master Mix i inkubacja w 50 °C przez 15 minut.
- 5. Transformacja komórek kompetentnych *E. coli* NEB 5-alfa produktem ligacji (etap ten opisano w sekcji 5.3.6.).

Zgodnie z zaleceniami NEB odnośnie klonowania 1-2 wstawek do wektora przy użyciu wymienionego zestawu, łączna ilość DNA w reakcji Gibson Assembly (GA) mieściła się w zakresie 0,03-0,2 pmol, zaś ilość DNA wektora zalecana do uzyskania wydajnego klonowania, mieściła się w zakresie 50-100 ng, z 2-krotnym nadmiarem każdej wstawki (ilość DNA, a nie objętość) (**Tabela 4**). Liczbę pmol obliczano korzystając z następującego wzoru: pmol = (masa w ng) x 1000 /(pary zasad x 650 daltonów).

Tabela 4. Objętości składników	zalecane dla przeprowadzer	nia reakcji klonowania	a metodą Gibson A	Assembly.
--------------------------------	----------------------------	------------------------	-------------------	-----------

	Łączenie 2-3 fragmentów	Kontrola pozytywna
Łączna masa fragmentów NEBuilder®	0,03-0,2 pmol X μl	10 µl
HiFi DNA Assembly Master Mix (2x)	10 µl	10 µl
woda dejonizowana	10-X µl	0 µl
Łączna objętość	20 µl	20 µl

5.3.6. Transformacja komórek kompetentnych E. coli NEB 5-alpha produktem ligacji

Produkt ligacji był początkowo transformowany do komórek *E. coli* NEB 5-alpha (High Efficiency), będących pochodnymi popularnych komórek DH5α, wywodzących się ze szczepu *E. coli* K12. Te szczepy bakteryjne pozbawione są genu kodującego polimerazę RNA T7, co zapobiega niestabilności plazmidu wywołanej ekspresją docelowego genu, którego produkt może być toksyczny dla szczepu gospodarza. Komórki NEB 5-alpha cechują się wysoką wydajnością transformacji niemetylowanym DNA, otrzymanym np. w reakcji PCR. Szczepy bakteryjne tego typu charakteryzują się również brakiem części nukleaz (endonukleazy I), co ma

zapobiegać degradacji "przyjętego" plazmidu i zapewniają uzyskanie wysokiej stabilności wstawki.

Etapy transformacji:

- 1. Rozmrożono komórki kompetentne na lodzie (10 min.).
- Dodano 2 µl schłodzonego produktu ligacji do komórek. Delikatnie wymieszano poprzez pipetowanie lub kilkukrotne lekkie potrząsanie probówką.
- 3. Umieszczono probówkę w lodzie na 30 minut.
- 4. Przeniesiono probówkę do termobloku ustawionego na 42 °C na 30 sek. w celu wywołania szoku cieplnego (*heat shock*).
- 5. Przeniesiono probówkę z powrotem do lodu na 2 minuty.
- 6. Wyjęto probówkę z lodu i uzupełniono 950 μl pożywki SOC (NEB) o pokojowej temperaturze (pożywka SOC zapewnia 2-krotnie wyższą wydajność transformacji, niż LB, jak podaje na swojej stronie producent, firma NEB (https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/transformation-protocol-c2528)).
- 7. Probówkę intensywnie wytrząsano w 37 °C przez 1 godzinę.
- Na płytkach z pożywką LA z kanamycyną (40 μg/ml) rozprowadzono równomiernie 100 μl rozcieńczonej hodowli komórek kompetentnych i inkubowano przez noc w 37 °C. Do kontroli pozytywnej zestawu do klonowania użyto płytek LA z ampicyliną (100 μg/ml).

Poza transformacją z użyciem badanych próbek, przeprowadzano również zalecane kontrole:

- kontrola komórek kompetentnych z użyciem plazmidu dołączonego do nich przez producenta (2 μl do komórek kompetentnych);
- kontrola transformacji z użyciem pustego plazmidu, używanego do klonowania (kontrola wzrostu komórek na podłożu z antybiotykiem);
- kontrola pozytywna zestawu do klonowania (PC, *Positive Control*) dołączona do tego zestawu przez jego producenta (2 μl do komórek kompetentnych).

5.3.7. PCR kolonijny

W celu szybkiej detekcji obecności wklonowanego genu bez etapu izolacji plazmidowego DNA z kolonii transformowanych komórek *E. coli*, przeprowadzono PCR kolonijny:

 Do osobnych probówek typu Eppendorf zawierających po 20 μl jałowej wody przenoszono ezą 5-10 kolonii z każdej płytki po nocnej inkubacji.

- Kroplę każdej zawiesiny nabierano tą samą ezą i wykonywano posiew na płytce z podłożem stałym (w celu późniejszego zbankowania poszczególnych kolonii zawierających plazmid z właściwą wstawką).
- 3. Eppendorfy z zawiesinami umieszczano na 5 min. w termobloku o temp. 100 °C.
- 4. Zawiesiny wirowano przez 3 min. przy 18 600x g.
- 5. Supernatant używano jako matrycę do reakcji PCR w celu wykrycia wstawki (3 μl z dużej kolonii, 5 μl z małej kolonii).

Amplifikację przeprowadzano dla odcinka między promotorem a terminatorem T7 wektora. Długość tego odcinka w nienaruszonym plazmidzie pET30-c(+) wynosi 367 bp, natomiast po wstawieniu w jego obrębie genu - 1160 bp. Reakcję PCR prowadzono według następującego protokołu:

Wstępna denaturacja	94 °C, 3 min	
Denaturacja	94 °C, 45 sek.	
Przyłączanie starterów	63 °C, 45 sek.	- 30x
Wydłużanie	72 °C, 75 sek.	
Końcowe wydłużanie	72 °C, 5 min.	

Mieszanina reakcyjna miała następujący skład:

Składniki	Końcowe stężenie	Objętość/20 µl
10x bufor RUN	1x	2,5 µl
2,5 mM dNTP	300 µM	2,5 µl
10 μM starter F	0,5 µM	1 µl
10 μM starter R	0,5 µM	1 µl
polimeraza RUN	0,035 U/µl	0,7 µl
DNA	1 pg-10 ng	3 µl
woda jałowa wolna od nukleaz		do 20 µl

W reakcji użyto polimerazy RUN z buforem reakcyjnym firmy A&A Biotechnology, czyli polimerazy DNA Taq o stęż. 1 U/µl. Zastosowano następujące startery: T7PP 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTG i T7TP 5'-CTAGTTATTGCTCAGCGGTGGCA. Jako kontroli zawierającej "pusty" odcinek użyto 1,5 µl pDNA plazmidu pET-30c(+) o stęż. 2,5 ng/µl.

5.3.8. Izolacja plazmidowego DNA

Po wstępnym zweryfikowaniu obecności wstawki w koloniach transformantów sprawdzanych za pomocą kolonijnego PCR, z transformantów ze wstawką izolowano pDNA. Do izolacji wykorzystywano zestawy QIAGEN Plasmid Mini Kit (Hilden, Niemcy; do izolacji z małych objętości) lub Plasmid Midi AX (A&A Biotechnology; do izolacji z dużych objętości).

5.3.9. Potwierdzenie obecności wklonowanych genów

Do oceny obecności i poprawnej orientacji wklonowanych wstawek wykorzystano reakcje PCR oraz sekwencjonowanie. Jako matrycy do PCR użyto wyizolowanego z transformantów plazmidowego DNA. PCR wykonano z użyciem starterów zaprojektowanych do amplifikacji odcinka między terminatorem a promotorem w DNA plazmidowym (T7PP i T7TP; patrz sekcja 5.3.7.) oraz odcinka oflankowanego przez starter T7PP i starter J5a_sekw_F (patrz sekcja 5.3.4. i **Ryc. 10**). W przypadku drugiego wymienionego odcinka, długość w nienaruszonym plazmidzie pET30-c(+) wynosi 321 bp, natomiast przy obecności w jego obrębie wstawionego genu - 1114 bp. Reakcję PCR dla tego fragmentu z użyciem polimerazy RUN (Taq) prowadzono według następującego protokołu:

Wstępna denaturacja	94 °C, 3 min.	
Denaturacja	94 °C, 40 sek.	
Przyłączanie starterów	60 °C, 30 sek.	- 30x
Wydłużanie	72 °C, 1 min.	
Końcowe wydłużanie	72 °C, 7 min.	

Do sekwencjonowania otrzymanego pDNA wykorzystano następującą parę starterów: T7TP od strony terminatora (patrz sekcja 5.3.7.) i pBRevBam_primer od strony promotora (5'-GGTGATGTCGGCGATATAGG). Zaplanowano, aby sekwencjonowany odcinek obejmował ok. 1267 bp, tak by możliwe było zweryfikowanie poprawności sekwencji całej wstawki z dokładnym objęciem początku i końca wklonowanych genów w obrębie DNA wektora.



Rycina 10. Regiony zawierające wstawkę i powielane w reakcjach PCR (wspólne dla trzech klonowanych genów). Startery T7PP i T7TP są komplementarne do rejonu flankującego region od promotora do terminatora (1160 bp). Odcinek między starterem J5a_sekw_F a T7PP zaznaczono fioletową linią (1114 bp). Czarna linia oznacza fragment sekwencji wektora.

5.3.10. Transformacja komórek kompetentnych *E. coli* BL21 konstruktami wektora z wklonowanym genem

Po potwierdzeniu poprawnego wklonowania genu docelowego do wektora plazmidowego, plazmid ten można przenieść do kolejnego bakteryjnego szczepu gospodarza, którego genom został zmodyfikowany tak, aby zawierał gen polimerazy RNA T7 pod kontrolą promotora LacUV5. Szczepy dedykowane do tego etapu klonowania są przeznaczone do przeprowadzania wydajnej ekspresji genówi pozbawione są proteaz OmpT i Lon, aby chronić

produkowane białka przed degradacją. Ekspresja genu polimerazy T7 jest w nich indukowana przez dodanie analogu laktozy IPTG do hodowli bakteryjnej przy OD₆₀₀ ~0,5.

Transformację komórek *E. coli* BL21 wykonano podobnie, jak transformację opisaną w sekcji 5.3.6., przy czym zamiast schłodzonego produktu ligacji do komórek kompetentnych dodawano 5 µl roztworu pDNA wyizolowanego plazmidu zawierającego wstawkę.

5.3.11. Indukcja ekspresji genów endolizyn i liza komórek bakteryjnych

Do przeprowadzenia indukcji użyto konstruktów plazmidowych z genem lizyny faga J5a (transformant J3) oraz lizyny faga F16Ba (transformant F2). Pożywkę LB o objętości 10 ml z dodatkiem kanamycyny (stęż. 40 μ g/ml) zaszczepiano pojedynczą kolonią szczepu bakterii *E. coli* BL21 zawierającego dany zrekombinowany plazmid, po czym hodowlę inkubowano całą noc w temp. 37 °C. Pięćset mikrolitrów nocnej hodowli dodawano do kolby zawierającej 500 ml świeżego LB z kanamycyną i hodowano silnie napowietrzając w 37 °C do momentu osiągnięcia przez hodowlę gęstości optycznej OD₆₀₀ ok. 0,5. Przy tej wartości OD przeprowadzano indukcję za pomocą 1 mM IPTG (izopropylo- β -D-1-tiogalaktopiranozyd). Hodowlę prowadzono do osiągnięcia OD₆₀₀ ok. 1,7.

W celu kontroli procesu ekspresji genów, z hodowli przed i po indukcji pobierano do probówek Eppendorfa próbki hodowli o objętości 2 ml. Próbki te wirowano (10 min., 18 600x g), osad zawieszano w buforze do sonikacji, a następnie sonikowano za pomocą homogenizatora ultradźwiękowego Vibra-Cell VCX-130 (SONICS, Newtown, CT, USA) w lodzie (30 sek./30 sek., 30% amplituda, 6 min.). Zawiesinę ponownie wirowano i rozdzielano na frakcję rozpuszczalną (supernatant) i nierozpuszczalną (osad). Osad zawieszano w niewielkiej objętości buforu do sonikacji. Otrzymane próbki mieszano z buforem próbkowym (MATERIAŁY 4.3.3.5.) w stosunku 3:1, umieszczano w łaźni wodnej na 5 min. w temp. 95 °C, a następnie analizowano za pomocą elektroforezy w denaturującym żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE).

Hodowlę bakteryjną (500 ml), po uzyskaniu OD_{600} ok. 1,7, wirowano przez 30 min. w 5000x g. Supernatant wylewano, osad ważono, a osadzone w nim bakterie lizowano za pomocą odczynnika BugBuster (BugBuster® Protein Extraction Reagent, Merck, Darmstadt, Niemcy) – 5 ml na 1 g osadu. Wraz z BugBusterem do osadu bakteryjnego dodawano: mieszaninę nukleaz w ilości 1 µl/1 ml BugBuster (Benzonase® Nuclease, Merck, 25 U/µl), inhibitor proteaz serynowych PMSF o stęż. wyjściowym 200 mM w ilości 5 µl/1 ml BugBuster oraz lizozym w ilości 1 KU/1 ml BugBuster. Całość inkubowano przez 20 min. z powolnym rotacyjnym wytrząsaniem, a następnie wirowano przez 20 min. w 4 °C, w 16 000x g. W celu późniejszej kontroli obecności dodatkowego białka w transformantach przeprowadzono takie samo doświadczenie dla szczepu *E. coli* BL21 z pustym plazmidem pET30-c(+), ale w mniejszych objętościach.

5.3.12. Oczyszczanie endolizyn na złożu niklowym Ni-NTA w warunkach natywnych

Do przeprowadzenia oczyszczania wykorzystano otrzymaną w poprzednim etapie frakcję płynną zawierającą docelowe białka. Supernatanty przefiltrowano przez filtr 0,45 µm i oczyszczano na złożu niklowym w reakcji chromatografii powinowactwa IMAC (od ang. *Immobilized Metal Affinity Chromatography*), której zasada opiera się na wykazywaniu przez białka z etykietką histydynową silnego powinowactwa do jonów niklu unieruchomionych w złożu. Dzięki temu, przepuszczając mieszaninę zlizowanych komórek bakteryjnych przez złoże umieszczone w kolumnie polipropylenowej, możliwe jest oddzielenie interesujących nas białek. Frakcja białek z etykietką histydynową pozostaje w złożu, skąd następnie, po wypłukaniu zanieczyszczeń, możemy je wypłukać za pomocą buforów z odpowiednią zawartością imidazolu. Związek ten ma wyższe powinowactwo do jonów niklu niż etykieta histydynowa i na zasadzie kompetycji wypiera przyczepione białka i uwalnia je do roztworu elucyjnego.

Przed oczyszczaniem polipropylenową kolumnę (Qiagen) upakowaną 50% złożem Ni-NTA przepłukano dwiema objętościami buforu wiążącego (jedna objętość jest liczona jako połowa objętości nałożonego złoża). Na złoże nanoszono następnie supernatant zmieszany z równą objętością buforu wiążącego i kolumnę lekko wytrząsano przez 1 godz. w 4 °C. Po tym czasie zbierano frakcję przepływającą przez złoże, dla lepszego efektu ponownie nanoszono do kolumnę i jeszcze raz zbierano. Przez złoże przepuszczano dwa razy dwie objętości buforu płuczącego w celu wypłukania białek niespecyficznie związanych ze złożem. Białka specyficznie związane na kolumnie wypłukiwano trzykrotnie dwiema objętościami buforu elucyjnego. Każdorazowo poszczególne frakcje zbierano do osobnych probówek, po czym analizowano ich zawartość za pomocą elektroforezy SDS-PAGE.

Po zakończeniu procesu chromatografii złoże zalewano 20% etanolem i trzymano w 4 °C. Przed ponownym użyciem złoże regenerowano przepłukując je 10-ma objętościami buforu MES pH 5,0, a następnie 10-ma objętościami wody jałowej.

5.3.13. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym

Próbki do analizy białek mieszano z buforem obciążającym w stosunku 3:1 i umieszczano na 5 min. w 95 °C. Zdenaturowane próbki nanoszono na wcześniej przygotowany żel poliakrylamidowy zawierający SDS. Elektroforezę prowadzono pod napięciem 130 V przez ok. 120 min., w 1x stężonym buforze do elektroforezy białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) w aparacie mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad). Po zakończeniu rozdziału żel barwiono w roztworze Coomassie Brilliant Blue przez 30 min., a następnie płukano w odbarwiaczu przez kilka godz./całą noc.

5.3.14. Immunodetekcja endolizyn za pomocą metody Western Blotting

W celu wizualizacji obecności otrzymanych białek z etykietką histydynową, przeprowadzono ich detekcję metodą Western Blotting z przeciwciałami przeciwko His-tag, skoniugowanymi z peroksydazą chrzanową (HRP, od ang. horseradish peroxidase). Niebarwiony żel po elektroforezie SDS-PAGE płukano przez 15 min. w buforze do blottingu (MATERIAŁY 4.3.9.1.). Membranę PVDF (od ang. polyvinylidene difluoride) do transferu (0,45 μm) początkowo aktywowano w metanolu (1-2 min.), płukano w wodzie (1 min.), a na koniec zalewano buforem do blottingu. Z namoczonych w tym samym buforze gąbek, bibuł Whatman, membrany i żelu poliakrylamidowego przygotowywano tzw. kanapkę, która umieszczano w aparacie mini-PROTEAN Tetra System (patrz sekcja 5.3.13.) i również zalewano buforem. Kolejność warstw od strony elektrody ujemnej do dodatniej była następująca: gabka, 3x bibuła, żel poliakrylamidowy, membrana PVDF, 3x bibuła, gąbka. Elektrotransfer prowadzono przez ok. 1 godz. pod napięciem 100 V, z umieszczonym w aparacie wkładem chłodzącym. Po wyjęciu kanapki membrane płukano w buforze TBST z 5% dodatkiem odtłuszczonego mleka w proszku przez 30 min., po czym dwukrotnie płukano po 10 min. w TBST. Do 10 ml buforu TBST z mlekiem dodawano 10 µl roztworu przeciwciał penta His HRP Conjugate (Qiagen) i w tej mieszaninie delikatnie bujano membranę przez 60 min. Po trzykrotnym płukaniu membrany buforem TBST (10 min. na każde płukanie), membranę umieszczano w mieszaninie 18 ml buforu DAB (Peroxide buffer) z 2 ml substratu dla peroksydazy HRP (DAB/metal concentrate, 10x) (Roche Diagnostics, Mannheim, Niemcy) i bujano do momentu pojawienia się brązowych prążków, wskazujących na obecność białka z etykietką histydynową.

5.3.15. Dializa i zagęszczanie białek za pomocą probówek Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Unit

Wybrane eluowane frakcje zawierające najwięcej oczyszczonego białka poddawano dializie w celu usunięcia z roztworu soli, imidazolu i innych związków niskocząsteczkowych oraz zmiany buforu, w którym białko było zawieszone. Buforem, w którym przeprowadzano dializę był 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5% glicerol (pH 8,0). Eluaty umieszczano w worku z membrany dializacyjnej SpectraPor® Standard Grade RC, MWCO 6000-8000 (SERVA, Heidelberg, Niemcy), uprzednio namoczonym w wodzie, szczelnie zamykano za pomocą

klipsów, a następnie woreczki z eluatem umieszczano w 2 l buforu i pozostawiano na noc na mieszadle magnetycznym w 4 °C, przy 200 obrotach/min.

Kolejnego dnia płyn z woreczka dializacyjnego odbierano do probówek Amicon® Ultra (Merck) o odcięciu 30 kDa w celu zagęszczenia białka. Probówki Amicon wirowano przy 4000x g, aż do zagęszczenia wyjściowej objętości do ok. kilkuset mikrolitrów (przez kilkadziesiąt minut). Po zakończeniu wirowania zawartość białka we frakcji zagęszczonej oraz przesączu kontrolowano za pomocą SDS-PAGE.

5.3.16. Oznaczanie stężenia białka w roztworze metodą Bradforda

Do oznaczania stężenia białek wykorzystywano spektrofotometr BioPhotometer UV/Vis Cuvette (Eppendorf). Pierwszym krokiem było przygotowanie krzywej wzorcowej dla albuminy bydlęcej. Szereg stężeń albuminy (0-2 mg/ml) mieszano w stosunku 1:30 z gotowym odczynnikiem Bradforda (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), inkubowano przez 5 min. w ciemności, a następnie mierzono odczyt przy długości fali 595 nm. Metoda ta opiera się na zdolności białek do tworzenia kompleksu z barwnikiem Coomassie Brilliant Blue (błękit Coomassie). Barwnik ten w środowisku kwaśnym ma zabarwienie brunatne, które zmienia się na niebieskie do granatowego w reakcji z białkiem. Natężenie barwy jest proporcjonalne do stężenia białka.

Rozcieńczenia albuminy bydlęcej wykonywano w 1x stężonym PBS pH 7,0 (Gibco, Waltham, MA, USA). Po ustaleniu krzywej wzorcowej, stężenie białek w badanych próbkach mierzono w taki sam sposób, jak opisano powyżej. Po wykonaniu pomiaru zagęszczone preparaty białkowe rozporcjowano do probówek po 30 µl, zamrożono w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temp. -75 °C.

5.4. Badanie aktywności litycznej otrzymanych endolizyn

5.4.1. Zymogram

W celu wizualizacji aktywności enzymatycznej endolizyn w żelu przygotowano zymogram. Próbki zawierające białka o stęż. 50 µg/ml mieszano z 2x stężonym buforem Laemmli, a następnie umieszczano na 5 min. w 95 °C. Bufor ten różni się od typowego buforu obciążającego do białek brakiem β -merkaptoetanolu – czynnika redukującego. Próbki ze zdenaturowanymi białkami nakładano na żel, w którym do żelu dolnego (rozdzielającego) dodano 60 µl preparatu ścian komórkowych *B. anthracis* 34F2, stanowiącego substrat dla endolizyn (patrz sekcja 5.4.1.1.). Po rozdziale przez ok. 90-120 min. w 130 V żel płukano w wodzie przez pół godz., a następnie umieszczano na kilka godzin lub na noc w buforze do

renaturacji. Bufor ten usuwa z żelu SDS, przez co pozwala białkom odzyskać dawną konformację. Renaturację prowadzono do momentu, aż w miejscu, gdzie reaktywowane białka enzymatyczne trawią peptydoglikan, pojawił się na tle mętnego, mlecznego żelu przejaśniony prążek.

5.4.1.1. Przygotowanie preparatu ścian komórkowych B. anthracis 34F2

W celu przygotowania substratu dla endolizyn w zymogramie, nocną hodowlę bakterii rozcieńczano 100-krotnie w 250 ml pożywki TSB i hodowlę prowadzono w 37 °C przy 200 rpm aż do uzyskania OD₆₀₀ równego 1. Hodowlę wirowano w temp. pokojowej przez 15 min., przy 10 000x g. Osad płukano za pomocą 250 ml ultraczystej wody (System oczyszczania wody Simplicity® UV, Merck Millipore), ponownie wirowano w tych samych warunkach i zawieszano w 30 ml wody. Zawiesinę komórek autoklawowano przez 15 min. w 121 °C i ponownie wirowano jak wyżej. Osad umieszczano na noc w temp. -20 °C, a na drugi dzień zawieszano w 3 ml wody i rozporcjowywano do trzech uprzednio zważonych probówek typu eppendorf. Otwarte probówki umieszczano w wyparce Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg, Germany) i suszono w temp 30 °C przez około 2 godziny. Wysuszone osady ważono i zawieszano razem w 1 ml wody.

5.4.2. Metoda płytkowa

W celu oceny aktywności endolizyn w agarze stałym, preparaty lizyn o różnych stężeniach, w zależności od uzyskanej po zagęszczaniu koncentracji, nakraplano (10 µl) na płytki dwuwarstwowe z 50 µl nocnej hodowli szczepu *B. anthracis* 34F2. Płytki umieszczano w temp. 37 °C na 4-6 godz., a po tym czasie oceniano obecność stref przejaśnienia w obrębie murawki bakteryjnej. W kolejnym kroku lizyny nakraplano na warstwy komórek zjadliwych szczepów wąglikowych z kolekcji ODiZZB WIHE: 211, 1153, 1583, 1584 i PZH oraz pozostałych szczepów bakteryjnych wymienionych w **Tabeli 2** (wyłączając szczepy: *B. cereus* ATCC 11778, *B. thuringiensis* T07-146 i *B. mycoides* K184). Jako kontrolę ujemną nakraplano 1x stężony PBS, służący do przygotowania rozcieńczeń (0 mg/ml).

5.4.2. Redukcja gęstości optycznej zawiesin bakterii

Aktywność endolizyn określano również metodą oceny redukcji gęstości optycznej zawiesin bakteryjnych. Do badań wykorzystano: szczep *B. anthracis* 34F2, pięć zjadliwych szczepów *B. anthracis* (211, PZH, 1153, 1583 i 1584) oraz 33 szczepy innych gatunków rodzaju *Bacillus* spośród wymienionych w **Tabeli 2** (wyłączając szczepy: *B. cereus* ATCC 11778, *B. thuringiensis* T07-146 i *B. mycoides* K184). Nocne hodowle rozcieńczano 100-krotnie

i hodowano w temp. 37 °C do uzyskania OD₆₃₀ równego 0,4-0,5, mierzonego w czytniku płytek w objętości używanej później w badaniu. Hodowlę wirowano przez kilka minut przy 18 600x g, po czym osad zawieszano w tej samej objętości 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. Doświadczenie prowadzono w płytce 96-dołkowej w objętości 200 μ l/dołek (20 μ l lizyny + 180 μ l zawiesiny bakteryjnej).

W doświadczeniach z użyciem szczepów *B. anthracis* badano różne stężenia końcowe lizyn. Doświadczenia wykonywano w trzech powtórzeniach. W kolejnym etapie działanie lizyn oceniano względem 33 szczepów z innych gatunków *Bacillus*, gdzie zastosowano jedno stężenie końcowe dla obydwu białek, a doświadczania wykonywano w dwóch powtórzeniach. Rozcieńczenia lizyn wykonywano w 1x stężonym PBS, który został również użyty w doświadczeniu jako kontrola ujemna (0 µg/ml). Płytki titracyjne umieszczano w czytniku Ultramark Microplate Imaging System (Bio-Rad) i prowadzono odczyty gęstości optycznej OD₆₃₀ co 5 min. w czasie 45 min. w temp. pokojowej.

6. WYNIKI

6.1. Charakterystyka wyizolowanych bakteriofagów

6.1.1. Izolacja i ocena zakresu gospodarza badanych bakteriofagów

Do badania specyficzności wykorzystanych było pięć nowych izolatów fagowych pochodzących z próbek środowiskowych zbieranych na terenie Polski oraz kilkanaście izolatów fagowych z kolekcji Pracowni Bakteriofagów ODiZZB WIHE, które nie były do tej pory różnicowane i badane. Wszystkie przetestowane izolaty były specyficzne wyłącznie wobec *B. anthracis* spośród wszystkich testowanych szczepów, na co wskazywała obecność pojedynczych łysinek. Szczepy *Bacillus* sp. *Ba* 813+, zawierające wąglikowy chromosomalny gen markerowy, okazały się niewrażliwe na te fagi

6.1.2. Wybór bakteriofagów do dalszych badań

Badaną pulę fagów oceniono pod względem czystości za pomocą metody PFGE (Ryc. 11a), a następnie ich genomy różnicowano za pomocą analizy restrykcyjnej wyizolowanego z nich DNA (**Ryc. 11b**). Analiza PFGE pozwoliła oszacować wielkość genomów testowanych fagów na ok. 40 kb oraz potwierdzić ich czystość. Dzięki analizie restrykcyjnej możliwe było wstępne wybranie izolatów o indywidualnym wzorze trawienia DNA. W następnym kroku dziewięć próbek DNA pochodzących z czystych i przypuszczalnie różnych fagów zostało zsekwencjonowanych, a na podstawie otrzymanych wstępnych wyników wybrano do dalszych szczegółowych badań trzy fagi najbardziej różniące się od siebie. Dodatkowo wstępna analiza porównawcza sekwencji ich genomów względem genomów innych znanych podobnych fagów potwierdziła zasadność tego wyboru. Żadna z kodowanych przez wybrane fagi endolizyn nie była opisana w bazie danych GenBank, a ich sekwencje wyraźnie różniły się od innych najlepiej poznanych do tej pory lizyn fagów wąglikowych. Wybrane fagi nosiły nazwy: J5a, z1a i F16Ba (odpowiednio: vB_BanS-J5a, vB_BanS-z1a oraz vB_BanS-F16Ba). Dwa pierwsze były nowymi izolatami pochodzacymi z próbek środowiskowych pobranych na terenie, odpowiednio, Podkarpacia oraz Lubelszczyzny. Fag F16Ba był pozyskany z próbek z terenów Podlasia i pochodził z kolekcji Pracowni Bakteriofagów. Tak jak nowe izolaty, został początkowo w ramach badań oczyszczony za pomocą servjnego pasażowania.



Rycina 11. Przykładowe obrazy żeli agarozowych przedstawiające rozdział genomów fagów J5a, F16Ba i z1a w PFGE (a) oraz różne wzory trawień restrykcyjnych DNA fagów J5a, F16Ba, 2C i z1a przy użyciu enzymów HaeIII i EcoRV (b). Markery wielkości: Low Range PFGE Marker (NEB) (a), SM0311 GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific) (b).

6.1.3. Mikroskopia elektronowa

Na podstawie analizy obrazów z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) przeprowadzonej dla trzech wybranych fagów, przypisano je taksonomicznie do morfotypu siphovirus klasy *Caudoviricetes* (**Ryc. 12**). Wiriony badanych fagów składają się z długiego, niekurczliwego ogonka oraz główki (kapsydu). Ogonki o średniej długości 188 nm kończą się centralnym włóknem ogonka (kolcem), który wystaje z płytki podstawnej (**Ryc. 12a**). Kapsydy o średnicy około 58 nm mieszczą DNA o długości około 40 kb, jak oszacowano na podstawie ich migracji w PFGE oraz potwierdzono za pomocą sekwencjonowania. Wszystkie te fagi tworzyły łysinki o średnicy około 1 mm lub mniejszej na warstwie komórek każdego z wrażliwych szczepów w agarze (**Ryc. 12**). Jedynie w przypadku łysinek faga J5a można było zaobserwować słabą strefę halo.



Rycina 12. Obrazy przedstawiające fagi: J5a (**a**), F16Ba (**b**) i z1a (**c**), wykonane za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Morfologie łysinek każdego faga są pokazane w prawym górnym rogu każdego obrazu TEM. Do obrazowania TEM fagi barwiono 2% octanem uranylu [25]. Skala odpowiada 100 nm.

6.1.4. Optymalne MOI

Zakażenie komórek szczepu gospodarza każdym z wybranych nowych fagów przy różnym MOI wykazało najwyższą produkcję potomstwa fagów J5a, F16Ba oraz z1a, gdy fagi i bakterie były zmieszane w stosunku 1:2, zatem MOI 0,5 stosowano we wszystkich kolejnych doświadczeniach.

6.1.5. Krzywa adsorpcji nowych bakteriofagów do komórek gospodarza oraz krzywa One Step Growth (OSG, krzywa jednostopniowego wzrostu)

Adsorpcja badanych fagów do komórek gospodarza rozpoczęła się tuż po zmieszaniu fagów z bakteriami, a wydajności adsorpcji były podobne. Około 70-85% fagów zaadsorbowało się po 30 min. trwania eksperymentu (**Ryc. 13a; Tabela 5**). Wyniki OSG wskazały na podobne okresy latencji oraz plon wszystkich trzech fagów (**Ryc. 13b; Tabela 5**).



Rycina 13. Parametry fizjologiczne fagów J5a, F16Ba i z1a: krzywe adsorpcji (**a**) oraz krzywe jednostopniowego wzrostu (**b**).

Tabela 5. Porównanie wydajności adsorpcji, wielkości plonu oraz czasów latencji dla fagów J5a, F16Ba i z1a.

Bakteriofag	Adsorpcja (30 min.)	Wielkość plonu (PFU)	Okres latencji (min.)
J5a	84,3%	20	35
F16Ba	72,4%	16,5	25
z1a	75,8%	17	30

6.1.6. Określenie wrażliwości nowych bakteriofagów J5a, F16Ba i z1a na zmiany pH i temperatury

Wszystkie trzy fagi były stabilne przy pH pomiędzy 3 a 11, bez statystycznie istotnych różnic między nimi. Nie odnotowano tworzenia się łysinek po inkubacji w buforze o pH 2 i 13 (**Ryc. 14**).



Rycina 14. Przeżywalność fagów J5a, F16Ba i z1a po inkubacji w różnych warunkach pH.

Wszystkie trzy fagi okazały się być równie stabilne w temperaturach 20 °C i 37 °C. Ich miano nieznacznie malało po dłuższej inkubacji w 50 °C (**Ryc. 15**). Fag z1a był najmniej stabilny w tej temperaturze, a jego miano spadło o około 1,5 rzędu wielkości po trzech godzinach. W temperaturze 60 °C i 70 °C można było zaobserwować znaczący, zależny od czasu spadek miana w przypadku wszystkich badanych fagów.





6.2. Analiza genomów trzech nowych bakteriofagów J5a, F16Ba i z1a oraz porównawcza analiza genomowa z podobnymi bakteriofagami

6.2.1. Ogólna charakterystyka genomów nowych bakteriofagów

Sekwencjonowanie całych genomów fagów J5a, F16Ba i z1a pozwoliło określić ich długość na odpowiednio: 40 353, 38 554 i 39 355 bp, co było spójne z wstępnymi wynikami uzyskanymi w PFGE (**Ryc. 11**). Podsumowanie ogólnych cech tych genomów przedstawiono w **Tabeli 6**.

Bakteriofag	Wielkość genomu (bp)	ść GC Liczba Najbliżej spokrewniony u (%) przewidywanych bakteriofag genów (numer w GenBank)		Najbliżej spokrewniony bakteriofag (numer w GenBank)	% Identyczności
J5a	40 353	35,17	63	Bacillus phage Tavor_SA (KY963369.1)	80,5
F16Ba	38 554	34,84	54	Bacillus phage Carmel_SA (KY963371.1)	87,1
z1a	39 399	35,10	58	Bacillus phage Carmel_SA (KY963371.1)	86,5

Tabela 6. Ogólne cechy genomów fagów J5a, F16Ba i z1a.

Zawartość par GC (%) w genomach wszystkich trzech fagów okazała się podobna do zawartości par GC (%) u ich gospodarza bakteryjnego *B. anthracis* (35,1%). Potwierdzono, że fagi te kodują odpowiednio 63, 54 i 58 białek oraz nie kodują tRNA. Nowe fagi okazały się podobne do siebie, a procent identyczności genomów pomiędzy nimi w parach wynosił odpowiednio: 85,3% (J5a vs. z1a), 81,5% (F16Ba vs. z1a) i 78% (F16Ba vs. J5a). Organizacja genów w genomach również okazała się podobna (**Ryc. 16**). W każdym z tych fagów zidentyfikowano gen kodujący endolizynę i holinę. Analiza porównawcza sekwencji genomowych nowych fagów z sekwencjami fagowymi przy pomocy programu BLASTn wykazała, że nowe fagi są blisko spokrewnione z fagami *B. anthracis*: Negev_SA, Carmel_SA i Tavor_SA, spokrewnionymi z fagiem Wbeta zaklasyfikowanym do rodzaju *Wbetavirus* w rodzinie poprzednio klasyfikowanej jako *Siphoviridae* w klasie *Caudoviricetes*. Podobieństwo nowych fagów między sobą oraz ich najbliższymi, wcześniej opisanymi krewnymi jest poniżej kryteriów demarkacyjnych, pozwalających zaklasyfikować dwa fagi do tego samego gatunku (95%; [43]), co wskazuje, że każdy z nowych fagów reprezentuje nowy gatunek.

J5a							
	5 67891012	13 14				37 38 39 41 42 43	
	5 000	10 000	15 000	20 000	25,000	30,000	35,000 40,000
F16Ba	5 000	10 000	15 000	20 000	23 23	50 000	33 000 40 000
	5 6 7 8 9 10 12	13 14	15 17 18				45 46 47 49 50 52 54
	5 000	10 000	15 000	20.000	25,000	30,000	35.000
z1a	5 000	10 000	13 500	20 000	23 000	50 000	55 000
	5 678910 12	13 14					45 46 47 49 50 52 55 58
	5 000	10 000	15 000	20 000	25 000	30 000	35 000
Legend: Pakowanie DNA	Formowanie kapsy	rdu/ 📕 Formowanie og	onka 📕 Holina 📕	Endolizyna Transkr	ypcja i	izogenii 🛛 📕 Białko hip	otetyczne 🗌 Inne białka

Rycina 16. Porównanie schematycznych map genomów fagów J5a, F16Ba i z1a. Zidentyfikowanym genom przypisano różne kolory w zależności od przewidywanych funkcji.

Kompletne sekwencje genomów fagów J5a, F16Ba i z1a zostały zdeponowane w bazie GenBank pod odpowiednimi numerami: MT745955, MT745954 i MT745956.

6.2.2. Ustalenie sekwencji i struktury końców cząsteczek DNA bakteriofagów J5a, F16Ba i z1a

Obecność produktu PCR ze starterami komplementarnymi do regionu przewidzianych końców DNA wirionu powstałego po zligowaniu końców DNA każdego z badanych fagów sugerowała obecność sekwencji *cos* na końcach cząsteczek DNA (**Ryc. 17**).



Rycina 17. Produkt reakcji PCR ze starterami komplementarnymi do przewidzianych przeciwległych rejonów blisko końców DNA wirionu i skierowanymi odpowiednio w stronę każdego z końców tak, by wykryć obecność fragmentu o długości 585 bp otaczającego sekwencję *cos* w fagach J5a, F16Ba i z1a. Marker wielkości DNA SM0311 GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific).

Wyniki sekwencjonowania otrzymanych produktów w przypadku wszystkich trzech nowych fagów wskazywały na obecność sekwencji CGCCGCCCC na końcu 5', zgodnie z wynikami analizy odczytów sekwencji genomowych z wykorzystaniem programu PhageTerm. Różnice w migracji elektroforetycznej łagodnie zdenaturowanego i niezdenaturowanego trawionego restrykcyjnie DNA w żelu potwierdziły, że sekwencje te reprezentują rejony *cos* (ang. *cohesive ends*) na końcach DNA, zgodnie ze wzorami rozdziału uzyskanymi *in silico* w programie SnapGene (**Ryc. 18, 19**). Ze względu na obecność lepkich końców wiele cząsteczek DNA z takimi końcami ulega zlepieniu. Po trawieniu zlepione fragmenty migrują w żelu jako jeden fragment o masie cząsteczkowej będącej sumą mas zlepionych fragmentów. Wzór prążków reprezentujących fragmenty trawionego fagowego DNA zmieniał się po podgrzaniu próbek DNA, ujawniając zdenaturowane fragmenty zawierające lepkie końce i pochodzące z fragmentów połączonych przez te końce przed denaturacją, jak w przypadku faga Lambda (**Ryc. 18a**). Temperatura 55 °C okazała się niewystarczająca do całkowitego rozdzielenia końców DNA.



Rycina 18. Różnice we wzorach migracji zdenaturowanych i niezdenaturowanych fragmentów DNA fagów J5a, F16Ba i z1a uzyskanych po trawieniu i rozdziale elektroforetycznym w 1% żelu agarozowym. Fragmenty, które zawierają sekwencje *cos* i migrują oddzielnie po częściowej denaturacji, zaznaczono czerwonymi kwadratami, podczas gdy produkty ich ligacji poprzez sekwencję *cos* powstałe w warunkach niedenaturujących, zaznaczono kwadratami zielonymi. (**a**) DNA faga Lambda trawione enzymem Pstl (11 497 + 2560 = 14 057 bp). Różnice w rozkładzie prążków są widoczne po denaturacji DNA w temperaturze 85 °C; (**b**) DNA faga J5a trawione enzymem PacI (5448 + 2508 = 7956 bp); (**c**) DNA faga F16Ba trawione enzymem PacI po podgrzaniu do 85 °C (3868 + 1877 = 5745 bp); (**d**) DNA faga z1a trawione enzymem PsuI (16 390 + 2203 = 18 413 bp). Marker wielkości DNA SM0311 GeneRuler 1 kb. Dla porównania, na **Ryc. 19** przedstawiono wzorce migracji przewidywane *in silico* za pomocą programu SnapGene.



Rycina 19. Wzory trawień restrykcyjnych wygenerowane *in silico* przy użyciu programu SnapGene dla DNA fagów Lambda, J5a, F16Ba i z1a, ukazujące oczekiwane różnice między trawionym DNA niepoddanym obróbce i poddanym działaniu wysokiej temperatury (formy liniowe). Marker wielkości DNA SM0311 GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific).

6.2.3. Analiza sekwencji przewidzianych białek nowych bakteriofagów J5a, F16Ba i z1a

Poszukiwanie homologów przewidywanych produktów genów J5a, F16Ba i z1a na poziomie sekwencji aminokwasowej i ich struktury oraz identyfikacja motywów sekwencji aminokwasowych związanych z funkcją pozwoliła na przypisanie funkcji prawie 50% tych białek (**Tabele 7-10, Zał. 1, 2**) Funkcje kilku innych białek można przewidzieć tylko nieprecyzyjnie na podstawie obecności w ich sekwencjach domniemanych helis transbłonowych lub motywów wiążących DNA. Zidentyfikowane homologi to w zdecydowanej większości białka fagów służących w niniejszych analizach jako fagi referencyjne, jednakże dla części białek najbliższe zidentyfikowane homologi są pochodzenia bakteryjnego, w tym profagowego (**Tabele 7-9**). Wyniki uzyskane przez analizę porównawcza przewidzianych struktur drugorzędowych wybranych białek przy użyciu programu HHpred pozwoliły określić prawdopodobne funkcje tych białek na podstawie charakterystyki poznanych białek o podobnych strukturach, pochodzących z bazy RCSB PDB (The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank) (**Tabela 10, Zał. 1, 2**).

Domeny białkowe z PHMMER	Terminase_4	Terminase_1	Phage_portal	Peptidase_S78	Phage_capsid	Phage_connect_ 1	Phage_H_T_join	HK97-gp10_like	DUF3168			
Identyczność sekwencji podobnego białka (%)	98,14	99,47	97,90	98,06	98,21	98,96	98,13	100	98,32	96,53	100	98,28
Pokrycie sekwencji podobnego białka (%)	100	100	66	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Najbardziej podobne białka z bazy danych GenBank (numer akcesyjny)	B. anthracis phage Gamma (ABB55435.1)	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58459.1)	B. anthracis phage Fah (YP_512313.1)	B. anthracis phage Gamma (ABB55432.1)	B. anthracis phage AP631 (AZF88350.1)	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58550.1)	B. anthracis phage Gamma (ABA46527.1)	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58482.1)	B. anthracis phage Gamma (YP_338192.1)	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58475.1)	B. anthracis phage Carmel_SA (AR W58548.1)	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58515.1)
Przewidywana funkcja	Terminase small subunit	Terminase large subunit	Portal protein	Prohead protease	Major capsid protein	Phage head-tail connector protein	Head-tail adaptor protein	Hypothetical protein (putative tail- component)	Conserved phage protein (putative structure protein)	Major tail protein	Hypothetical protein	Hypothetical protein
Iq	9,92	5,03	6,23	5,11	5,04	4,71	6,57	9,62	5,44	5,17	4,46	5,17
Dlugość produktu (aa)/Przewidywa na masa molekularna (kDa)	161/18,43	565/65,04	432/48,82	206/23,68	392/44,42	96/11,15	107/12,2	146/16,24	119/13,92	202/22,96	105/11,64	64/7,81
Pozycja ORF (bp)	63-548	545-2242	2258-3556	3519-4139	4178-5356	5374-5664	5661-5984	5977-6417	6414-6773	6774-7382	7432-7749	7761-7955
ORF	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.

Tabela 7. Przewidziane produkty białkowe genomu faga J5a i ich proponowane funkcje. Podano procentowe wartości pokrycia i identyczności najbardziej podobnych białek zgodnie z danymi uzyskanymi przy użyciu programu BLASTp. Białka porównywano z białkami wirusowymi lub, jeśli nie znaleziono homologów wirusowych, również bakteryjnymi. Zidentyfikowane peptydy sygnałowe i domeny transhonowe oznaczono odnowiednie isto s r MAD
13.	7972-11823	1283/139,32	8,48	Tail length tape-measure protein	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58458.1)	100	97,43	PhageMin_Tail, 3 TMDs
14.	11838-13328	496/56,98	6,60	Distal tail protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58399.1)	100	90,52	Sipho_tail
15.	13325-17254	1309/147,41	5,34	Tal/RBP (Tail lysozyme/receptor- binding protein)	B. anthracis phage Carnel_SA (ARW58514.1)	100	79,87	Peptidase_S74
16.	17293-17529	78/8,67	6,44	XpaF1 protein (hemolysin Xhla1 family protein)	uncultured <i>Caudoviricetes</i> phage (ASN69604.1)	100	93,59	XhlaA, TMD
17.	17529-17768	79/8,38	9,16	Holin	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58494.1)	100	93,67	2 TMDs
18.	17765-18820	351/39,33	9,20	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58406.1)	100	95,16	Amidase_2, SP
19.	Complement (18862-19188)	108/12,29	9,70	Hypothetical protein	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58500.2)	100	92,59	TMD
20.	Complement (19244-19438)	64/7,26	9,36	Repressor protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58551.1)	96	91,94	HTH_3
21.	19598-19900	104/12,73	4,81	Hypothetical protein	Bacillus phage BVE2 (AUG88604.1)	100	94	
22.	19903-20085	60/6,74	9,70	Hypothetical protein	Bacillus phage BVE2 (AUG88603.1)	100	90	2 TMDs
23.	20095-21384	429/49,69	6,78	FtsK/SpoIIIE family protein (cell division protein FtsK)	B. anthracis phage Wbeta (YP_459986.1)	100	95,34	FtsK_SpoIIIE
24.	21311-21943	210/25,18	9,84	Conserved phage protein	B. anthracis phage Wbeta (YP_459987.1)	100	97,62	Replic_Relax
25.	Complement (21977-22213)	78/8,62	6,15	HTH cro/Cl-type domain- containing protein (putative transcription regulator)	B. anthracis phage Gamma (YP_338207.1)	100	100	HTH_26
26.	22377-22496	39/45,97	4,23	Hypothetical protein	B. anthracis phage Gamma (YP_338208.1)	100	100	DUF3961, TMD
27.	22509-23372	287/33,38	8,85	Conserved phage protein (HTH domain-containing protein)	B. anthracis phage Gamma (YP_338209.1)	100	97,56	HTH_36

28.	23470-24924	484/57,57	8,96	Site-specific recombinase	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58402.1)	88	96,05	Recombinase
9.	25083-26369	428/49,89	6,15	Hypothetical protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58400.1)	100	98,60	
30 .	26272-26412	46/52,03	8,25	AimP	B. anthracis phage Tavor_SA (-)	100	97,83	SP, TMD
31.	26518-26673	51/61,08	4,93	Hypothetical protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58446.1)	100	94,12	
32.	Complement (26702-27061)	119/13,75	6,17	Hypothetical protein (HTH cro/C1 family protein)	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58421.1)	100	99,16	HTH_3
33.	27223-27450	75/8,75	8,53	Hypothetical protein (HTH cro/C1 family protein)	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58442.1)	100	100	HTH_3
34.	27535-27702	55/6,59	9,15	Hypothetical protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58453.1)	98	96,30	
35.	27776-27931	51/5,99	10,45	Hypothetical protein	B. anthracis phage Fah (YP_512340.1)	100	94,12	
36.	27949-28695	248/29,14	5,51	Putative antirepressor	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58528.1)	100	97,98	ORF6C
37.	28762-29415	217/25,81	6,22	Hypothetical protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58412.1)	100	83,87	
38.	29544-30464	306/36,04	8,55	Replication initiation protein	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58468.1)	100	93,57	Phg_2220_C
39.	30480-31391	303/34,94	8,70	Putative DNA replication protein DnaC	B. anthracis phage Gamma (YP_338216.1)	100	97,69	
40.	31410-31643	77/9,17	7,93	Hypothetical protein	B. anthracis phage Gamma (ABA46469.1)	100	93,51	
41.	31636-32382	248/28,27	6,16	Sigma-70 family RNA polymerase sigma factor (RNA polymerase sporulation specific sigma factor SigF)	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58471.1)	100	97,58	Sigma70_r2
12.	32379-32855	158/18,97	9,24	Hypothetical protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58419.1)	100	95,57	

43.	32913-33455	180/21,16	5,89	Dimeric dUTPase	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58535.1)	100	95,56	dUTPase_2
	33496-33675	59/6,82	8,03	Hypothetical protein	B. cereus AFS001538 (PET50494.1) (Wbeta-like prophage region)	100	98,31	
	33847-34017	56/6,05	4,50	Hypothetical protein	B. cereus FSL W8-0268 (KXY22003.1) (Wbeta-like prophage region)	100	98,21	
	34047-34649	200/23,67	6,04	Hypothetical protein	B. thuringiensis GBAC46 (PRT13233.1) (Wbeta-like prophage region)	100	79	
•	34844-35077	77/9,14	5,25	Hypothetical protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58441.1)	100	97,40	
	35098-35259	53/6,12	9,37	Hypothetical protein	Bacillus virus IEBH (YP_002154356.1)	100	100	
	35449-35565	38/43,31	3,96	Hypothetical protein	B. cereus VD045 (EJR26235.1)	100	100	
	35601-36041	146/17,47	4,77	Hypothetical protein	uncultured <i>Caudoviricetes</i> phage (ASN69632.1)	48	98,59	
•	36188-36439	83/10,11	5,42	Hypothetical protein	uncultured <i>Caudoviricetes</i> phage clone 9AX_2 (ASN69632.1)	98	95,12	
	36570-36860	96/11,09	10,21	Hypothetical protein	B. thuringiensis 4XX2 (MRA88504.1) (Wbeta-like prophage region)	100	96,88	
	36847-37035	62/7,09	4,61	Hypothetical protein	B. anthracis phage Gamma (ABB97503.1)	100	90,32	
	37188-37310	40/4,88	11,52	Hypothetical protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58455.1)	100	100	DUF3983
	37483-37878	131/15,57	6,34	Sigma70_r4 domain-containing protein	B. anthracis phage Wbeta (YP_460009.1)	100	98,47	Sigma70_r4
_	37998-38222	74/8,52	5,09	Hypothetical protein	B. anthracis phage Gamma (ABA46507.1)	100	86,49	
1								

						HNH	
97,26	92,66	100	97,62	100	80,49	98,43	
100	100	100	100	100	89	100	
B. anthracis phage AP631 (AZF88397.1)	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58546.1)	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58447.1)	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58435.1)	B. anthracis phage Gamma (YP_338234.1)	B. anthracis phage AP631 (AZF88400.1)	B. anthracis phage Gamma (YP_338236.1)	
Hypothetical protein	Hypothetical protein	Hypothetical protein	Hypothetical protein	Hypothetical protein	Hypothetical protein	HNH endonuclease	
5,61	9,41	4,44	9,08	8,82	5,55	9,49	
73/8,21	109/13,4	63/7,14	84/10,18	48/5,60	137/15,33	127/15,55	
38229-38450	38456-38785	38786-38977	38997-39251	39272-39418	39450-39863	39932-40315	
57.	58.	59.	60.	61.	62.	63.	

76	

ORF	Pozycja ORF (bp)	Dlugość produktu (aa)/Przewidyw ana masa molekularna (kDa)	Iq	Przewidywana funkcja	Najbardziej podobne bialka z bazy danych GenBank (numer akcesyjny)	Pokrycie sekwencji homologiczn ego białka (%)	Identyczność sekwencji homologiczneg o bialka (%)	Domeny bialkowe z PHMMER
1.	63-548	161/18,47	9,84	Terminase small subunit	B. anthracis phage Gamma (ABB55435.1)	100	97,52	Terminase_4
2.	545-2242	565/65,17	5,10	Terminase large subunit	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58516.1)	100	99,82	Terminase_1
3.	2258-3556	432/48,82	6,21	Portal protein	B. anthracis phage Fah (YP_512313.1)	66	97,90	Phage_portal
4.	3519-4139	206/23,72	5,11	Prohead protease	B. anthracis phage Gamma (YP_338187.1)	100	99,51	Peptidase_S78
5.	4178-5356	392/44,25	5,03	Major capsid protein	B. anthracis phage Gamma (ABB55431.2)	100	99,23	Phage_capsid
6.	5374-5664	96/11,17	4,71	Phage head-tail connector protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58550.1)	100	96,88	Phage_connect_1
7.	5661-5984	107/12,19	5,80	Head-tail adaptor protein (phage head-tail joining protein)	B. anthracis phage Gamma (ABA46527.1)	100	99,07	Phage_H_T_join
8.	5977-6417	146/16,24	9,62	Hypothetical protein (putative tail component)	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58482.1)	100	100	HK97-gp10_like
9.	6414-6773	119/13,95	5,21	Conserved phage protein (putative structure protein)	B. anthracis phage Gamma (YP_338192.1)	100	98,32	DUF3168
10.	6774-7382	202/22,88	5,16	Major tail protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58414.1)	100	99,50	
11.	7433-7750	105/11,68	4,35	Hypothetical protein	B. anthracis phage AP631 (AZF88356.1)	100	100	
12.	7780-7956	58/7,02	5,13	Hypothetical protein	B. anthracis phage Gamma (YP_338195.1)	100	100	

Tabela 8. Przewidziane produkty białkowe genomu faga F16Ba i ich proponowane funkcje. Podano procentowe wartości pokrycia i identyczności najbardziej podobnych białek zgodnie z danymi uzyskanymi przy użyciu programu BLASTp. Białka porównywano z białkami wirusowymi lub, jeśli nie znaleziono homologów wirusowych, również bakteryjnymi. Zidentyfikowane peptydy sygnałowe i domeny transbłonowe oznaczono odpowiednio jako SP i TMD.

13.	7973-11824	1283/ 139,25	8,35	Tail length tape-measure protein	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58458.1)	100	99,06	PhageMin_Tail, 3 TMDs
14.	11839-13329	496/56,91	7,04	Distal tail protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58399.1)	100	97,98	Sipho_tail
15.	13326-17393	1355/151,99	5,34	Tal/RBP (Tail lysozyme/receptor- binding protein)	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58514.1)	100	90,29	Peptidase_S74
16.	17432-17668	78/8,70	6,21	XpaF1 protein	uncultured <i>Caudoviricetes</i> phage (ASN69604.1)	100	92,31	XhIA, TMD
17.	17668-17907	79/8,37	9,16	Holin	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58494.1)	100	94,94	2 TMDs
18.	17904-18959	351/39,41	9,32	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58406.1)	100	98,29	Amidase_2, SP
19.	Complement (18998-19327)	109/12,36	9,70	Hypothetical protein	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58500.2)	100	98,17	TMD
20.	Complement (19395-19988)	197/22,98	5,26	Hypothetical protein	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58476.1)	86	96,91	T4SS-DNA_transf
21.	Complement (19985-20182)	65/7,39	8,93	Repressor protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58551.1)	100	93,85	HTH_3
22.	20342-20650	102/12,50	5,20	Hypothetical protein	Bacillus phage BVE2 (AUG88604.1)	98	89	
23.	20647-20829	60/6,69	9,70	Conserved phage protein	B. anthracis phage Gamma (ABB72450.1)	100	96,67	2 TMDs
24.	20839-22128	429/49,63	6,54	FtsK/SpoIIIE family protein (cell division protein FtsK)	B. anthracis phage Wbeta (YP_459986.1)	100	95,57	FtsK_SpoIIIE
25.	22055-22687	210/25,20	9,84	Conserved phage protein	B. anthracis phage Wbeta (YP_459987.1)	100	98,10	Replic_Relax
26.	Complement (22721-22957)	78/8,62	6,15	HTH cro/C1-type domain- containing protein (putative XRE family transcriptional regulator)	B. anthracis phage Gamma (YP_338207.1)	100	100	HTH_26
27.	23122-23241	39/45,97	4,23	Hypothetical protein	B. anthracis phage Gamma (YP_338208.1)	100	100	DUF3961, TMD

28.	23254-24117	287/33,37	8,98	Conserved phage protein (HTH domain-containing protein)	B. anthracis phage Gamma (YP_338209.1)	100	99,65	HTH_36
29.	24193-25638	481/56,42	9,16	Site-specific recombinase	B. anthracis phage AP631 (AZF88373.1)	100	99,17	Resolvase
30.	25741-27075	444/51,24	7,45	Hypothetical protein	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58462.1)	100	98,87	
31.	26984-27133	49/54,14	9,73	AimP	B. anthracis phage Wbeta (-)	100	100	Kinase domain protein (fragment), SP, TMD
32.	27272-27394	40/47,03	8,77	Hypothetical protein	B. anthracis phage AP631 (AZF88375.1)	100	87,50	
33.	Complement (27416-27772)	118/13,62	6,30	Hypothetical protein (HTH Cro/C1 family protein)	B. anthracis phage Wbeta (YP_459993.1)	100	99,15	HTH_31
34.	27932-28159	75/8,80	8,52	Hypothetical protein (HTH Cro/C1 family protein)	B. anthracis phage Wbeta (YP_459994.1)	100	100	HTH_3
35.	28199-28357	52/6,06	6,23	Conserved phage protein	B. anthracis phage Wbeta (YP_45995.1)	100	100	
36.	28429-28584	51/6,04	10,28	Hypothetical protein	B. anthracis phage Fah (YP_512340.1)	100	98,04	
37.	28602-29348	248/29,17	5,83	Putative antirepressor	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58528.1)	100	96,77	ORF6C
38.	29376-29753	125/14,80	5,10	Hypothetical protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58544.1)	100	95,20	
39.	29760-30410	216/25,47	7,65	Hypothetical protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58530.1)	100	92,59	
40.	30539-31480	313/36,85	7,74	Replication initiation protein	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58468.1)	100	96,17	Phg_2220_C
41.	31496-32407	303/34,92	8,81	Putative DnaC protein (putative replication protein)	B. anthracis phage Wbeta (ABC40434.1)	100	98,68	
42.	32426-32659	77/9,14	7,93	Hypothetical protein	B. anthracis phage Wbeta (ABC40435.1)	100	98,33	

43.	32652-33398	248/28,20	5,72	RNA polymerase sporulation specific sigma factor	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58411.1)	100	100	Sigma70_r2
44.	33395-33871	158/18,97	9,13	Hypothetical protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58419.1)	100	99,37	
45.	33929-34471	180/21,17	5,26	Dimeric dUTPase	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58535.1)	100	97,22	dUTPase_2
46.	Complement (34598-35383)	261/31,33	6,79	Beta-galactosidase	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58527.1)	100	92,72	Sulfotransfer_2
47.	35686-35874	62/7,22	4,54	Hypothetical protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58563.1)	100	88,71	
48.	36027-36149	40/4,81	10,77	Conserved phage protein	<i>B. anthracis</i> phage Gamma (ABA46517.1)	100	92,50	DUF3983
49.	36322-36717	131/15,60	5,99	Sigma70_r4 domain-containing protein	B. anthracis phage Wbeta (YP_460009.1)	100	97,71	Sigma70_r4
50.	36902-37321	139/16,25	4,78	Hypothetical protein	B. thuringiensis KB1 (KX002459.1) (Wbeta-like prophage region)	100	94,96	DUF3775
51.	37382-37606	74/8,54	6,58	Hypothetical protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58558.1)	100	94,59	
52.	37613-37834	73/8,18	5,86	Hypothetical protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58445.1)	100	98,63	
53.	37841-38095	84/10,24	8,97	Hypothetical protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58435.1)	100	89,29	
54.	38133-38516	127/15,48	9,46	HNH endonuclease	B. anthracis phage Fah (YP_512360.1)	100	97,64	HNH
1	1	1	1			1	1	

ość Domeny ji białkowe meg z PHMMER %)	Terminase_4	Terminase_1	Phage_portal	Peptidase_S78	Phage_capsid	Phage_connect_1	Phage_H_T_join	HK97-gp10_like	DUF3168			
Identyczne sekwencj homologicz o białka (°	99,38	100	97,69	98,54	100	100	97,20	100	97,48	97,52	99,05	93,10
Pokrycie sekwencji homologiczn ego białka (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	06
Najbardziej podobne bialka z bazy danych GenBank (numer akcesyjny)	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58537.1)	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58516.1)	B. anthracis phage Gamma (YP_338186.1)	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58474.1)	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58522.1)	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58550.1)	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58547.1)	B. anthracis phage Negev_SA (ARW58482.1)	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58545.1)	B. anthracis phage Gamma (YP_338193.1)	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58548.1)	B. anthracis phage Gamma (YP 338195.1)
Przewidywana funkcja	Terminase small subunit	Terminase large subunit	Portal protein	Prohead protease	Major capsid protein	Phage head-tail connector protein	Head-tail adaptor protein	Hypothetical protein (putative tail component)	Hypothetical protein (putative structure protein)	Major tail protein	Hypothetical protein	Hypothetical protein
Iq	9,88	5,07	7,08	5,11	5,04	4,71	7,87	9,62	5,21	5,27	4,46	4,97
Dlugość produktu (aa)/Przewidyw ana masa molekularna (kDa)	161/18,52	565/65,17	432/48,78	206/23,7	392/44,22	96/11,15	107/12,28	146/16,24	119/13,94	202/22,88	105/16,67	64/7,68
Pozycja ORF (bp)	63-548	545-2242	2258-3556	3519-4139	4178-5356	5374-5664	5661-5984	5977-6417	6414-6773	6774-7382	7431-7748	7760-7954
ORF	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.

Tabela 9. Przewidziane produkty białkowe genomu faga zla i ich proponowane funkcje. Podano procentowe wartości pokrycia i identyczności najbardziej podobnych białek zgodnie z danymi uzyskanymi przy użyciu programu BLASTp. Białka porównywano z białkami wirusowymi lub, jeśli nie znaleziono homologów wirusowych, również bakteryjnymi. Zid

13.	7971-11822	1283/139,40	7,94	Tail length tape-measure protein	B. anthracis phage AP631 (AZF88358.1)	100	91,58	PhageMin_Tail, 3 TMDs
14.	11837-13327	496/56,84	7,14	Distal tail protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58517.1)	100	98,39	Sipho_tail
15.	13324-17250	1308/147,40	5,36	Tal/RBP (Tail lysozyme/receptor- binding protein)	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58514.1)	100	83,76	
16.	17289-17525	78/8,67	6,41	XpaF1 protein	uncultured Caudoviricetes phage (ASN69604.1)	100	92,31	XhIA, TMD
17.	17525-17764	79/8,32	9,52	Holin	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58439.1)	100	100	2 TMDs
18.	17761-18816	351/39,23	9,20	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58406.1)	100	96,58	Amidase_2, SP
19.	Complement (18855-19184)	109/12,39	9,70	Hypothetical protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58540.1)	100	99,08	TMD
20.	Complement (19252-19836)	194/22,74	5,28	Hypothetical protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58533.1)	100	97,94	T4SS-DNA_transf
21.	Complement (19842-20039)	65/7,40	7,87	Repressor protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58551.1)	100	98,46	HTH_3
22.	20199-20507	102/12,48	5,06	Hypothetical protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58549.1)	100	98,04	
23.	20504-20686	60/6,70	9,70	Conserved phage protein	B. anthracis phage Gamma (YP_338204.1)	100	96,67	2 TMDs
24.	20696-21985	429/49,43	8,80	Cell division protein FtsK	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58520.1)	100	98,83	FtsK_SpolIIE
25.	21912-22544	210/25,25	9,84	Conserved phage protein	B. anthracis phage Wbeta (YP_459987.1)	100	98,57	Replic_Relax
26.	Complement (22577-22813)	78/8,65	5,23	Hypothetical protein (putative phage regulatory protein)	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58556.1)	100	100	HTH_26
27.	22977-23096	39/4,63	4,56	Hypothetical protein	B. anthracis phage AP631 (AZF88371.1)	100	84,62	DUF3961, TMD
28.	23112-23975	287/33,50	8,70	Hypothetical protein (HTH domain-containing protein)	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58408.1)	100	94,08	HTH_36

29.	24073-25527	484/57,53	8,90	Site-specific recombinase	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58402.1)	88	97,91	Recombinase
30.	25686-26972	428/50,01	6,33	Hypothetical protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58400.1)	100	98,36	
31.	26875-27015	46/50,99	8,25	AimP	B. anthracis phage Tavor_SA (-)	100	91,30	SP, TMD
32.	27077-27280	67/8,10	6,26	Hypothetical protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58446.1)	100	94,03	
33.	Complement (27308-27667)	119/13,70	6,21	Hypothetical protein (HTH Cro/C1 family protein)	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58421.1)	100	100	HTH_3
34.	27829-28056	75/8,74	8,55	Hypothetical protein (HTH Cro/C1 family protein)	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58442.1)	100	96	HTH_3
35.	28143-28307	54/6,46	9,15	Hypothetical protein	B. anthracis phage Tavor_SA (ARW58453.1)	100	98,15	
36.	28381-28536	51/5,99	10,35	Hypothetical protein	B. anthracis phage Fah (YP_512340.1)	100	90,20	
37.	28554-29300	248/29,21	5,52	Putative antirepressor	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58528.1)	100	97,98	ORF6C
38.	29328-29705	125/14,94	4,77	Hypothetical protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58544.1)	100	99,20	
39.	29712-30362	216/25,60	7,65	Hypothetical protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58530.1)	100	95,83	
40.	30491-31459	322/38,04	6,31	Putative phage replisome organizer protein	B. anthracis phage Gamma (ABA46496.1)	100	90,37	Phg_2220_C
41.	31475-32386	303/34,81	8,91	DNA replication protein DnaC (ATP-binding protein)	B. anthracis phage Gamma (YP_338216.1)	100	95,71	
42.	32405-32638	77/9,22	5,84	Hypothetical protein	B. anthracis phage AP631 (AZF88385.1)	100	89,61	
43.	32631-33377	248/28,26	5,90	RNA polymerase sporulation specific sigma factor	B. anthracis phage Gamma (YP_338218.1)	100	94,76	Sigma70_r2
44.	33374-33850	158/18,86	9,14	Hypothetical protein	B. anthracis phage Carmel_SA (ARW58538.1)	100	96,20	

6.2.4. Analiza filogenetyczna

Poszukiwanie w bazie GenBank sekwencji podobnych do sekwencji genomów fagów J5a, F16Ba i z1a ujawniło, oprócz fagów Negev_SA, Carmel_SA i Tavor_SA, siedem innych genomów o ponad 70% identyczności, w tym faga Wbeta oraz fagów do niego podobnych: AP631, Cherry, Fah i trzech izolatów fagów Gamma (**Ryc. 20**). Sekwencja genomowa kolejnego najbliżej spokrewnionego faga *Bacillus*, phIS3501 z rodzaju *Camtrevirus* (GenBank JQ062992), jest identyczna z sekwencjami nowych fagów tylko w 27-31%. Porównanie sekwencji J5a, F16Ba i z1a z sekwencjami ich najbliższych krewnych za pomocą programu Viridic, który oblicza odległości międzygenomowe/podobieństwa dla par genomów wirusowych, ujawniło, że wszystkie te fagi, razem z fagiem *B. anthracis* Wbeta, można w oparciu o kryteria demarkacji przyjęte dla fagów tego samego rodzaju (70% identyczności lub więcej [179], **Ryc. 20**) zaklasyfikować do rodzaju *Wbetavirus*.

Grupowanie fagów klasyfikujących się w obrębie rodzaju Wbetavirus w oparciu o kryteria demarkacji przyjęte dla gatunków fagów, pozwoliło podzielić je na 11 gatunków (**Ryc.** 20), zgrupowanych w dwa kolejne klastry, które mogą reprezentować dwa rodzaje. Na poparcie tego założenia, drzewo filogenetyczne oparte na analizie pełnego proteomu pokazało zakwalifikowanie tych gatunków do dwóch kladów (**Ryc. 21a**). Fagi J5a, F16Ba i z1a grupuja się razem z wyizolowanymi niedawno w Izraelu fagami Negev_SA, Carmel_SA i Tavor_SA [6], które nie zostały jak do tej pory szczegółowo zbadane. Podobieństwo DNA między fagami z tych dwóch kladów we wszystkich przypadkach z wyjątkiem jednego przekroczyło 70%, dlatego zaproponowano włączenie ich wszystkich do rodzaju Wbetavirus razem z fagiem Wbeta i rozdzielenie ich na dwa klady w ramach tego rodzaju, tj. klad J5a i klad Wbeta. Wyróżnienie dwóch kladów wśród fagów blisko spokrewnionych z Wbeta koreluje z różnicami między proteomami fagów reprezentujących każdy klad. Używając programu CoreGenes określono, że pula wszystkich 13 fagów ma tylko 31 wspólnych przewidywanych CDS-ów oraz że fagi z kladu Wbeta dzielą ich 36, a fagi z kladu J5a 41. Drzewa filogenetyczne utworzone na podstawie sekwencji głównego białka kapsydu (MCP) oraz białka dużej podjednostki terminazy, również zgrupowały fagi J5a, F16Ba i z1a oddzielnie od historycznych izolatów Wbeta, Gamma i Cherry (**Ryc. 21bc**).



Rycina 20. Porównanie całych genomów oraz zgrupowanie fagów J5a, F16Ba, z1a i ich najbliższych krewnych. Porównanie i klastrowanie przeprowadzono za pomocą programu Viridic [127]. Różne odcienie niebieskiego w prawej połowie mapy reprezentują różny stopień podobieństwa (w %) między genomami każdej porównywanej pary, jak wskazano w legendzie powyżej mapy i określono liczbowo. Lewa połowa mapy pokazuje trzy wartości wskaźnikowe dla każdej pary genomów: porównana część genomu 1 dla genomu w tym wierszu (górna wartość), stosunek długości genomu dla dwóch genomów w tej parze (wartość środkowa) i porównana frakcja genomu 2 dla genomu w tej kolumnie (wartość dolna). Ciemniejsze kolory reprezentują niższe wartości, jak wskazano w opisie nad mapą.



Rycina 21. Analiza filogenetyczna fagów J5a, F16Ba, z1a i najbliżej spokrewnionych fagów na podstawie podobieństwa sekwencji całych proteomów obliczonego przez tBLASTx, przeprowadzona przy użyciu programu ViPTree [137] (a); drzewo filogenetyczne wygenerowane na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej głównego białka kapsydu (b); drzewo filogenetyczne wygenerowane na podstawie podobieństwa dużej podjednostki terminazy (c). Pionowe linie ciągłe na prawo od drzewa filogenetycznego w (a) oznaczają fagi, które zostały już zaklasyfikowane do poszczególnych rodzajów. Pionowe linie kropkowane wskazują fagi, które na podstawie wyników niniejszej pracy można zaliczyć do rodzaju *Wbetavirus*. Nazwa pierwotnego faga tego rodzaju (Wbeta) jest zaznaczona na zielono. Fagi zaproponowanego kladu J5a są oznaczone czerwonymi gwiazdkami. Gałęzie drzewa filogenetycznego, które wskazują na ich oddzielenie od fagów kladu Wbeta, są zaznaczone na czerwono. W drzewach filogenetycznych (b, c) wykorzystano klastrowanie metodą UPGMA (od ang. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) i zweryfikowano za pomocą współczynnika korelacji kofenetycznej (BioNumerics). Przy odpowiednich gałęziach pokazano odległości ewolucyjne.

6.2.5. Analiza porównawcza genomów nowych bakteriofagów J5a, F16Ba i z1a

Wielkości genomów fagów J5a, F16Ba i z1a oraz organizacja genów w ich genomach są zbliżone do wielkości genomów i organizacji genów ich krewnych z kladów J5a i Wbeta. Liniowe przyrównanie sekwencji wszystkich 13-tu genomów uwydatniło ich kolinearność i podobną organizację modułów funkcjonalnych w genomach fagów nowych i referencyjnych (**Ryc. 22**). W przypadku fagów J5a, F16Ba i z1a większość genów podlega transkrypcji w jednym kierunku (odpowiednio 59 z 63, 48 z 54 i 53 z 58).



Rycina 22. Syntenia genów w genomach fagów J5a, F16Ba, z1a oraz znanych lub proponowanych przedstawicieli rodzaju *Wbetavirus*. Uliniowienie genomów zostało wykonane przy użyciu programu Geneious Prime. Przewidywane geny kodujące białka (CDS) są oznaczone kolorami w zależności od homologii sekwencji aminokwasowych tych białek (przyjętej od poziomu 70% wzwyż) lub funkcji. CDS-y kodujące unikalne białka w fagach J5a, F16Ba i z1a, bez homologów wśród innych wbetawirusów otrzymały osobne kolory. Jeśli 2-6 fagów miało podobną sekwencję białka, odpowiednim CDS-om nadano wspólny kolor. Jeśli więcej niż 6 fagów miało podobną sekwencję białka, CDS-y pozostawiono zielone. Jasnozielony kolor wskazuje CDS-y kodujące białka, które nie są znacząco podobne pod względem sekwencji, ale są odpowiedzialne za pełnienie tej samej funkcji we wszystkich genomach. Dodatkowo przeszukano puste regiony w genomach fagów referencyjnych, ujawniając obecność wcześniej niezidentyfikowanych otwartych ramek odczytu. Po potwierdzeniu nowe geny zostały dopisane w odpowiednich miejscach na mapie i oznaczone ciemnozielonym kolorem, a ich spis umieszczono w **Zał. 3** (patrz także **Zał. 4**). Lokalizacja pozostałych genów tych fagów również została dodatkowo zweryfikowana, co ujawniło potrzebę zmiany niektórych ich koordynatów (ORF-y takie oznaczono gwiazdką w **Zał. 4**). Długości strzałek nie zawsze korelują z liczbą nukleotydów w obszarze, który obejmuje strzałka. Długość skali odpowiada sekwencji konsensusu obejmującej przerwy.

Moduły na lewych końcach genomów nowych fagów i innych wbetawirusów odpowiadają za kodowanie funkcji morfogenetycznych wirusów (pakowanie DNA, strukturę główki i ogonka oraz dojrzewanie wirionów) i są prawie identyczne (**Tabele 7-9, Ryc. 22**). Moduły centralny i prawy są bardziej zróżnicowane i zawierają kilka genów specyficznych dla kladu oraz pewne geny różnicujące poszczególne fagi w ramach każdego kladu (**Tabele 7-9, Ryc. 22**).

Podobieństwa między przewidywanymi strukturami niektórych produktów genów lewego modułu kodujących białka ogonka, a strukturami białek ogonka niektórych innych fagów ujawniły przypuszczalną strukturę maszynerii fagowej odpowiedzialnej za rozpoznawanie i penetrację komórek gospodarza przez wbetawirusy (patrz Tabela 10 i Zał. 1). Przewidywane struktury N- i C-końcowych części białka J5a 014 i jego odpowiedników w innych wbetawirusach są podobne do struktur części N- i C-końcowych dystalnych białek ogonka (Dits - ang. Distal tail proteins) faga SPP1 Bacillus, faga TP901-L Lactococcus oraz wirusa 80alfa Staphylococcus. Centralna część tych białek jest podobna do modułu CBM2 białka ogonka (moduł wiążący reszty cukrowe) obecnego u faga J-1 Lactobacillus casei. Białka Dit wspomnianych fagów są zlokalizowane pomiędzy kanałem ogonka, a jego końcówką i zostały zaproponowane jako pełniące funkcję platformy dokowania aparatu adsorpcji ogonka siphowirusów bakterii Gram-dodatnich, tworzącej centrum płytki podstawnej [69, 100, 184, 185]. Centralne fragmenty Dit faga J-1 Lactobacillus casei i białek Dit niektórych innych fagów bakterii Gram-dodatnich wiaża specyficzne reszty cukrowe obecne na powierzchni bakterii i odgrywają rolę w interakcji z komórkami gospodarzy bakteryjnych [33, 66]. Na podstawie wyżej wymienionych podobieństw stwierdzono, że J5a 014 i jego odpowiedniki u innych wbetawirusów działają jako białka Dit tych fagów.

Tabela 10. Wyniki analizy podobieństwa przewidzianych struktur wybranych białek faga J5a do znanych struktur białek z bazy danych PDB uzyskane przy użyciu programu HHpred: Dit (J5a_014) (**a**), Tal/RBP (J5a_015) (**b**) i endolizyny (J5a_018) (**c**) wraz ze schematycznym pokazaniem lokalizacji rejonów strukturalnego podobieństwa ich sekwencji względem białek z bazy danych. W tabelach pokazano kilka najlepszych wyników z regionami dopasowania, identyfikatorem PDB i prawdopodobieństwem HHpred (%) dopasowania tych regionów. Na rysunkach sekwencje białek Dit, Tal/RBP i endolizyny faga J5a są przedstawione schematycznie jako suwaki odpowiednio na górze każdego z uliniowień. Dopasowania do białek lub domen białkowych z bazy danych PDB są pokazane jako poziome grube linie poniżej, wskazując ich pokrycie w odniesieniu do zapytania. Linie te są oznaczone numerami akcesyjnymi PDB pasujących struktur i kodowane kolorami zgodnie z ich wynikiem podobieństwa do zapytania (od czerwonego jako najbardziej podobnego, przez pomarańczowy do zielonego).

ORF	Długość białka (aa)	Region dopaso- wania (aa)	Najlepsze dopasowania HHpred	PDB ID	Prawdo- podo- bieństwo (%)
J5a_014	496		Tail component; bacteriophage infection, Lactobacillus casei,		
		190-437	fluorescence microscopy, Carbohydrate Binding Module, sugar binding protein; 1.28A { <i>Lactobacillus</i> phage J-1}	5LY8_A	99,98
	-	2-196	HYPOTHETICAL PROTEIN 19.1; VIRAL PROTEIN, DISTAL TAIL PROTEIN; 2.95A {BACILLUS PHAGE SPP1}	2X8K_C	99,85
	-	1-197	Distal tail protein, Receptor-binding protein, Phage baseplate, host adsorption apparatus, genome injection device, VIRAL PROTEIN; 3.8A { <i>Lactococcus</i> phage TP901-1}	4V96_AX	99,77
		1-200	Distal Tail Protein, gp58; phage tail, tail tip, tape measure protein, VIRAL PROTEIN; 3.7A { <i>Staphylococcus</i> virus 80alpha}	6V8I_BD	99,65
	-	1-200	LACTOCOCCAL PHAGE P2 ORF15; BASEPLATE, VIRAL PROTEIN; 2.6A { <i>Lactococcus</i> Phage P2}	2WZP_Q	98,21
			190	437	
		2X8 4V96 6V81 2WZ	5LY8_A	2X8K_C 4V96_AX 6V8I_BD 50UN_A	

(**a**)

ORF	Długość białka (aa)	Region dopaso- wania (aa)	Najlepsze dopasowania HHpred	PDB ID	Prawdo- podo- bieństwo (%)
J5a_015	1309	6-378	Tail-Associated Lysin, gp59; phage tail, tail tip, tape measure protein VIRAL PROTEIN; 3.7A { <i>Staphylococcus</i> virus 80alpha}	6V8I_CE	99,94
		3-356	Protein gp18; NP_465809.1, prophage tail protein gp18, Structural Genomics, Joint Center for Structural Genomics, JCSG, Protein Structure Initiative; HET: MSE, MLY; 1.7A { <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> EGD-e}	3GS9_A	99,90
	-	29-355	Tail protein, 43 kDa; tail protein, structural genomics, PSI, MCSG, Protein Structure Initiative, Midwest Center for Structural Genomics, UNKNOWN FUNCTION; 2.1A { <i>Neisseria</i> <i>meningitidis</i> MC58} SCOP: b.106.1.1	3D37_A	99,08
		1166-1289	Long tail fiber distal subunit; Bacteriophage, Helical sandwich, Tail fiber, polyglycine, VIRAL PROTEIN; HET: MRD, MPD, IMD; 1.70355818561A { <i>Salmonella</i> phage vB_SenMS16}	6F45_B	96,25
		1166-1297	Isoform 2 of Myelin regulatory factor; auto-catalytic protease, protein chaperone. trimeric protein, triple coiled-coil, membrane PROTEIN; HET: MSE; 2.4A { <i>Mus musculus</i> }	7DC3_A	95,93
	-	1166-1283	Endo-N-acetylneuraminidase; Chaperone, Glycosidase, Hydrolase; HET: TAM, PEG; 2.6A {Enterobacteria phage K1F}	3GW6_B	95,76
	-	1166-1279	L-SHAPED tail fiber protein; viral protein, bacterial viruses, caudovirales, siphoviridae, infection; HET: FLC; 2.52A {ENTEROBACTERIA PHAGE T5}	4UW8_H	95,19
		1100-1271	Tail spike protein; bacteriophage, tailspike, <i>Acinetobacter baumannii</i> , gp42, VIRAL PROTEIN; HET: MSE; 1.794A { <i>Acinetobacter</i> phage vB_AbaP_AS12}	6EU4_B	87,82



(U)

ORF	Długość białka (aa)	Region dopaso- wania (aa)	Najlepsze dopasowania HHpred	PDB ID	Prawdo- podo- bieństwo (%)
J5a_018	351	46-192	Bifunctional autolysin; peptidoglycan, autolysin, amidase, N- acetylmuramoyl-L-alanine amidase, HYDROLASE; HET: IMD, PEG;	4KNK_A	99,76
	_	45-192	Autolysin; LytA, pneumococci, autolysis, amidase, peptidoglycan complex, antibiotics, hydrolase; HET: NAG, DGL, AMV; 1.05A { <i>Streptococcus pneumoniae</i> serotype 4}	5CTV_A	99,54
	-	45-194	Endolysin; amidase-2 domain, HYDROLASE; HET: ZN; 2.27A { <i>Staphylococcus</i> phage GH15}	40LS_A	99,50
	-	2-186	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase; amidase, zinc binding, cell wall degradation, endolysine, hydrolase; HET: PO4, GOL; 1.21A { <i>Clostridium intestinale</i> }	6SSC_A	99,41
	-	26-190	prophage LambdaBa02, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, family 2; N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, PlyL, E.C.3.5.1.28, HYDROLASE; HET: PO4; 1.86A { <i>Bacillus</i> <i>anthracis</i> } SCOP: d.118.1.1	1YB0_B	99,38
	-	199-349	L-alanyl-D-glutamate peptidase; listeria, endolysin, cell wall binding domain, bacteriophage, VIRAL PROTEIN; 1.59A {Listeria phage A500}	6HX0_A	98,51
	-	209-349	putative dipeptidyl-peptidase VI; Structural Genomics, Joint Center for Structural Genomics, JCSG, Protein Structure Initiative, PSI-2, HYDROLASE; HET: GOL, CSA, MSE; 1.72A { <i>Bacteroides ovatus</i> }	3NPF_A	97,65
	-	210-350	Clan CA, family C40, NlpC/P60 superfamily cysteine peptidase; peptidase, NlpC protein, HYDROLASE; 1.2A { <i>Trichomonas</i> <i>vaginalis</i> }	6BIO_A	97,61
	-	220-351	NLP/P60 family protein; NLPC/P60 FAMILY PROTEIN, STRUCTURAL GENOMICS, JOINT CENTER FOR STRUCTURAL GENOMICS, JCSG, PROTEIN STRUCTURE INITIATIVE, PSI-2, HYDROLASE; HET: PG4, MSE, DGL; 1.79A { <i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987}	3H41_A	97,35
		209-349	Ply protein; alpha/beta hydrolase, multi-domain, hydrolase; 1.8A { <i>Listeria</i> phage PSA} SCOP: c.56.5.6, l.1.1.1, b.34.11.4	1XOV_A	96,61
	46		192		
_		6	4KNK_A 6HX0_A 5CTV_A 3NPF_I 40LS_A 6BI0_I SSC_A 3H4:	A A 1_A	
•				7	

Przewidywana struktura N-końca białka J5a_015 i jego odpowiedników u innych wbetawirusów jest podobna do struktury N-końca lizyny związanej z ogonkiem (Tal, ang. *tailassociated lysin*) wirusa 80alfa *Staphylococcus* [185] i N-końców odpowiednich białek niektórych innych fagów (**Tabela 10b**). Przewidywana struktura C-końcowej części J5a_015 jest podobna do struktury C-końca długiego włókna ogonka faga vB_SenMS16 *Salmonella*, kolca

ogonka faga vB AbaP AS12 Acinetobacter baumannii, włókna ogonka w kształcie litery L faga T5 wewnatrzcząsteczkowego Enterobacterium. białka opiekuńczego endo-Nacetyloneuraminidazy z kolca ogonka faga K1F Enterobacteria, a także wewnątrzcząsteczkowej autokatalitycznej proteazy białka opiekuńczego myszy domowej Mus musculus, (Tabela 10b). Wewnątrzcząsteczkowe domeny białkowe pełniące funkcje białek opiekuńczych zostały zidentyfikowane na C-końcach długiego włókna ogonka lub białek kolców ogonków kilku niespokrewnionych fagów, w tym fagów K1F i T5 Enterobacteria. Biora one udział w tworzeniu charakterystycznej dla tych białek potrójnej β-helisy, a także ulegają samoodcięciu od białek docelowych po zakończeniu procesu fałdowania, odsłaniając domenę wiążącą receptor lub domene depolimerazy egzopolisacharydowej [60, 166]. Niektóre białka podobne do białek Tal w ich N-końcowych częściach i określane jako Tal/RBP (Tal/receptor-binding protein) zawierają dodatkowe fragmenty, które działają jako domeny wiążące receptor. Opierając się na podobieństwach różnych części białka J5a 015 do części różnych białek Tal lub Tal/RBP, wywnioskowano, że białko J5a 015 tworzy kolec ogonka wbetawirusów i pełni funkcję Tal/RBP.

Centralny moduł genomów wbetawirusów zawiera geny, których produkty biorą udział w lizie komórek gospodarza, kontroli lizogenii, replikacji oraz transkrypcji. Organizacja genomowa regionów położonych bezpośrednio za genami endolizyny również różni się między fagami kladu J5a i kladu Wbeta. W fagach kladu J5a region ten zawiera gen kodujący przewidywane białko błonowe o nieznanej funkcji (J5a_019) i, z wyjątkiem faga J5a, gen kodujący białko o przewidzianej strukturze podobnej do struktury białka TrwB biorącego udział w transporcie DNA plazmidu R388 *E. coli* podczas koniugacji [175]. W fagach kladu Wbeta region ten koduje przewidywaną lipoproteinę.

Następny zróżnicowany region znajduje się bezpośrednio za genem rekombinazy (*site-specific recombinase*) (**Ryc. 22**). W modelowym fagu Wbeta reprezentuje on moduł kontroli lizogenii i obejmuje pięć genów (wp28–wp32), w tym gen dla represora fagowego podobnego do cI (*cI-like repressor*), represora podobnego do cro (*cro-like repressor*) i geny antyrepresora [162]. W fagach Cherry i tych izolatach Gamma, które są obligatoryjnie litycznymi pochodnymi faga Wbeta, regiony te zawierają obszerne delecje obejmujące jeden lub oba geny represorowe (*cI-like* oraz *cro-like*) oraz trzy poprzedzające geny. Żadna z tych delecji nie występuje w fagach kladu J5a, co sugeruje, że fagi te są zdolne do lizogenizacji gospodarza, przynajmniej w pewnych warunkach.

Region poprzedzający gen represora podobnego do cI, który w fagach Gamma i Cherry jest objęty delecja, w pozostałych fagach koduje dwa białka z niedawno zidentyfikowanego systemu komunikacji fagowej arbitrium, AimR i AimP [46, 172]. AimR to wewnątrzkomórkowy feromonowy receptor odpowiadający za wybór między lizą a lizogenią w zależności od stężenia feromonu heksapeptydowego, który jest uwalniany przez komórki zakażone fagami i jest produktem genu aimP. W oparciu o podobieństwa białek, białka AimR/AimP fagów Wbeta dziela się na dwie grupy. Jedna jest reprezentowana przez większość fagów kladu J5a (J5a, z1a, Tavor SA i Carmel SA), podczas gdy pozostałe fagi posiadające białko AimP (F16Ba, Negev SA, AP631, Fah i Wbeta) stanowią drugą grupę. Końcowe heksapeptydy białka AimP, które odpowiadają dojrzałym feromonom układu arbitrium uwalnianym w wyniku trawienia, różnią się u obydwu tych grup jedną resztą aminokwasową (TIKPGG vs. EIKPGG, dla odpowiednio pierwszej i drugiej grupy). Może to sugerować, że system arbitrium fagów J5a, z1a, Tavor SA i Carmel SA "wyczuwa" inne heksapeptydy, niż system arbitrium innych wbetawirusów analizowanych w tej pracy. Wiadomo, że N-końcowe reszty aminokwasowe niektórych feromonów arbitrium specyficznie oddziałują z AimR [31]. Co więcej, heksapeptydowy feromon EIKPGG faga Wbeta pozbawiony początkowej reszty kwasu glutaminowego (E) nie mógł zastapić funkcji nienaruszonego feromonu [172]. Może to sugerować, że system arbitrium fagów J5a, z1a, Tavor SA i Carmel_SA "wyczuwa" inne heksapeptydy niż system arbitrium innych wbetawirusów analizowanych w tej pracy.

Najbardziej zróżnicowane regiony wbetawirusów znajdują się na prawych końcach ich DNA (**Ryc. 22**). Zawierają głównie geny o nieznanej funkcji. W przypadku faga J5a region ten zawiera osiem genów, których przewidywane produkty nie mają homologów wśród białek innych fagów spokrewnionych z Wbeta (**Tabele 7-9**). Pięć hipotetycznych białek J5a kodowanych przez ten region (J5a_044, J5a_045, J5a_046, J5a_049 i J5a_052) oraz jedno hipotetyczne białko faga F16Ba (F16Ba_050) mają tylko homologi pochodzenia bakteryjnego. Analiza genomów bakteryjnych kodujących te homologi za pomocą programu PHASTER, który identyfikuje regiony profagowe w bakteryjnym DNA, ujawniła, że wszystkie te białka są kodowane przez geny regionów profagowych podobnych do faga Wbeta w szczepach *B. cereus* i *B. thuringiensis* (**Tabele 7-9**). Pozostałe białka, które nie posiadały homologii z produktami genów fagów podobnych do Wbeta wykazały podobieństwo do białek o nieznanych funkcjach innych fagów.

Ostatni z genów na prawym końcu genomów wbetawirusów jest zakonserwowany we wszystkich tych genomach i koduje białko o przewidywanej funkcji endonukleazy HNH (HNHE). Przewidywana struktura tego białka jest uderzająco podobna na całej długości do struktury HNHE termofilnego bakteriofaga głębinowego GVE2 *Geobacillus* sp. Ponadto sekwencje aminokwasowe HNHE wbetawirusów są w 50-51% identyczne z sekwencją HNHE faga GVE2, a reszty niezbędne dla aktywności nacinania DNA przez endonukleazę tego faga [199] są w nich również zakonserwowane.

6.2.6. Porównanie endolizyn i holin kodowanych przez nowe bakteriofagi z kodowanymi przez podobne fagi z rodzaju *Wbetavirus*

Wszystkie trzy nowe fagi, podobnie jak pozostałe wbetawirusy, kodują endolizyny o aktywności N-acetylomuramylo-L-Ala-amidaz. Holiny i endolizyny kodowane przez centralny moduł we wszystkich porównywanych fagach różnią się znacznie między fagami kladu J5a i Wbeta (**Ryc. 22, Zał. 4**). Endolizyny fagów kladu J5a są o około 50% dłuższe od tych z kladu Wbeta (~351 reszt aa vs. 233 reszty aa), a ich sekwencje wykazują słabe podobieństwo do lizyn fagów kladu Wbeta jedynie w regionie kodującym domenę katalityczną amidaz (27% pokrycia i 23% identyczności). Dodatkowo lizyny fagów kladu J5a, w odróżnieniu od pozostałych, posiadają na swoim N-końcu sekwencję peptydu sygnałowego, na co wskazały wyniki analizy białek z wykorzystaniem programu SignalP 5.0.

Poszukiwanie homologów strukturalnych endolizyny faga J5a (J5a 018) z wykorzystaniem programu HHpred i bazy danych struktur białkowych ujawniło dwudomenową strukturę tej endolizyny (Tabela 10c). Przewidywana struktura regionu, który występuje bezpośrednio po sekwencji sygnałowej (aa 46-192) jest bardzo podobna do przewidywanej struktury domeny N-acetylomuramylo-L-Ala-amidazy (AmiA; 4KNK_A) dwufunkcyjnej, liczącej 1256 reszta aminokwasowych autolizyny AtlA Staphylococcus aureus, do N-acetylomuramylo-L-Ala amidazy (PlyL) rodziny 2 z profaga LambdaBa02 B. anthracis (1YB0 B) oraz do innych domen katalitycznych lizyn o podobnej aktywności (Tabela 10c). Reszty aminokwasowe His-265, His-370 i Asp-384, które bezpośrednio koordynują rozmieszczenie jonu cynku w autolizynie AtlA, a także pobliskie reszty Glu-324 i His-382, które uczestniczą w katalizie przeprowadzanej przez AtlA [21], są zachowane w J5a 018. Przewidywana struktura C-końcowa lizyny J5a 018 (aa 199-349), która powinna reprezentować domenę wiążącą ścianę komórkową (CBD, od ang. cell wall-binding domain), jest bardzo podobna do struktury CBD endolizyny Ply500 faga A500 Listeria (6HX0_A), endolizyny Ply faga PSA Listeria (1XOV A) i endopeptydazy YkfC γ-D-glutamylo-L-diaminokwasu B. cereus (3H41_A) (B. cereus γ-d-glutamyl- L -diamino acid endopeptidase YkfC) oraz do domen CBD niektórych innych białek trawiących peptydoglikan (Tabela 10c). Domeny CBD enzymów Ply500, Ply i YkfC zawierają dwie kopie powtórzeń struktur beta-beczułki (ang. beta-barrel)

podobnych do SH3b [168, 193], co sugeruje, że domeny CBD endolizyn fagów kladu J5a również zawierają dwie kopie takich powtórzeń.

Region w genomach fagów kladu J5a, który w fagach kladu Wbeta koduje 141 aa holine klasy III, prawie identyczną z holinami fagów Bacillus z rodzaju Rockvillevirus i Camtrevirus (wśród nich fag phIS3501, GenBank NC_019502), koduje dwa mniejsze białka. Jedno z nich (XpaF1, 78 aa) zawiera przewidywaną domenę transbłonową i jest podobne do białek rodziny hemolizyn XhlA 1. Niektóre białka z motywem rodziny XhlA (pfam10779; Tabele 7-9) są hemolizynami związanymi z powierzchnią komórki, które powodują lizę granulocytów i plazmatocytów owadów, a także erytrocytów królika i konia [36]. Jednakże białka podobne do XhlA kodowane przez moduły lityczne faga SPP1 Bacillus oraz defektywnego profaga PBSX, które są odpowiednio w 35% i 33% identyczne z białkami podobnymi do XhlA z fagów kladu J5a (jak wskazują wyniki porównań przy użyciu programu BLASTp), pełnią funkcję holin [49]. Stąd przypisano funkcję holiny również białkom podobnym do XhlA fagów kladu J5a. Drugie małe białko modułu litycznego kladu J5a (w J5a: J5a 017, 79 aa) ma dwie domeny transbłonowe i C-koniec bogaty w reszty lizyny. Cechy te są charakterystyczne dla holin klasy II [196]. Dodatkowo białko to jest w 28% identyczne z holiną Hol44 faga fOG44 Oenococcus oeni (według obliczeń BLASTp), która również ma dwie domeny transbłonowe i "współpracuje" z endolizyną zawierającą peptyd sygnałowy podczas lizy komórek [142, 154, 156].

6.3. Otrzymanie kodowanych przez bakteriofagi białek o aktywności litycznej (endolizyn)

6.3.1. Klonowanie genów kodujących zmodyfikowane endolizyny bakteriofagów J5a, F16Ba i z1a w wektorze ekspresyjnym

Analiza genow kodujacych endolizyny trzech fagów za pomocą programów: SignalP 5.0., PrediSi (http://www.predisi.de/), TOPCONS (https://topcons.cbr.su.se/), SOSUIsignal (https://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosuisignal/sosuisignal_submit.html) i Phobius (https://phobius.sbc.su.se/), wykazała we wszystkich tych genach obecność sekwencji kodującej peptyd sygnałowy (SP, od ang. *signal peptide*, o długości 27 aa). Ponieważ endolizyny zawierające SP nie wymagają udziału holin do transportu przez błonę komórkową bakterii, są w warunkach nadprodukcji toksyczne dla komórek powodując ich lizę, klonowano geny endolizyn w formie zmodyfikowanej, pozbawionej SP. W celu sklonowania tych genów przygotowano zaprojektowane wcześniej (patrz sekcja 5.3.3. i 5.3.4.) produkty PCR zawierające wektor w postaci liniowej o zakładanej wielkości 5238 bp oraz trzy wstawki o zakładanej wielkości 1020 bp każda (**Ryc. 23**).



Rycina 23. Żele agarozowe przedstawiające wektor pET30-c(+) (**a**) oraz wstawki (**b**) jako produkty PCR służące do ligacji. Markery wielkości: SM0311 GeneRuler 1 kb (a), Quick-Load Purple 1 kb Plus DNA Ladder (NEB) (b).

Po przeprowadzeniu reakcji ligacji wektora i poszczególnych wstawek oraz transformacji otrzymanych konstruktów do komórek kompetentnych *E. coli* NEB 5-alpha, uzyskano kolonie transformantów na podłożu selekcyjnym z kanamycyną. W wyniku wstępnej analizy puli wybranych kolonii za pomocą reakcji PCR kolonijnego powielającego fragment między terminatorem a promotorem T7 DNA plazmidowego (T7TP-T7PP) otrzymano produkty o długości 1160 bp, świadczące o obecności klonowanych genów w poszczególnych transformantach (**Ryc. 24**).





Rycina 24. Zdjęcia żeli agarozowych ukazujących fragmenty DNA między promotorem a terminatorem T7 wektora, obejmujące sklonowane geny kodujące zmodyfikowane endolizyny fagów J5a, F16Ba i z1a. Pokazano dziewięć transformantów (TR: J1-J9) zawierających plazmid z wklonowanym genem kodującym zmodyfikowaną lizynę faga J5a (**a**) oraz po dwa transformanty (TR: F1, F2, z1, z2) zawierające plazmidy z wklonowanymi genami

kodującymi zmodyfikowane lizyny fagów F16Ba i z1a (b). Jako kontrolę "pustego" fragmentu użyto pDNA plazmidu pET30-c(+), dającego produkt o wielkości 367 bp. Marker wielkości SM1333 GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Z transformantów, w przypadku których wstępnie potwierdzono obecność wklonowanyche genów zmodyfikowanych endolizyn fagów J5a, F16Ba i z1a, wybrano kilka do przeprowadzenia izolacji plazmidowego DNA. Otrzymane pDNA wykorzystano jako matrycę do przeprowadzenia reakcji PCR z użyciem pary starterów T7PP oraz J5a_sekw_F, jak opisano w sekcji 5.3.9. i pokazano na **Ryc. 10** (strona 57). Reakcja ta również potwierdziła obecność wklonowanych genów dając produkty o wielkości 1114 bp (**Ryc. 25**), a dodatkowo potwierdziła ich poprawną orientację.



Rycina 25. Żel agarozowy ukazujący fragmenty DNA obejmujące sklonowane geny kodujące zmodyfikowane endolizyny fagów J5a, F16Ba i z1a, w transformantach TR: J3, J6, F1, F2, z1 i z2 po reakcji PCR z użyciem starterów T7PP i J5a_sekw_F. Jako kontrolę "pustego" fragmentu użyto pDNA plazmidu pET30-c(+), dającego produkt o wielkości 321 bp. Marker wielkości Quick-Load Purple 1 kb Plus DNA Ladder.

Wyniki sekwencjonowania plazmidowego DNA z wykorzystaniem startera T7TP od strony terminatora i startera pBRevBam_primer od strony promotora jednoznacznie potwierdziły obecność i poprawność wklonowanych genów kodujących zmodyfikowane endolizyny trzech fagów. Na ich podstawie wybrano do produkcji białek po jednym transformancie o bezbłędnej sekwencji wklonowanego genu.

6.3.2. Ekspresja genów kodujących zmodyfikowane endolizyny bakteriofagów J5a, F16Ba i z1a

Ekspresję genów kodujących endolizyny fagów J5a, F16b i z1a przeprowadzono w komórkach pochodnych szczepu *E. coli* BL21 zawierających plazmidy ze skonowanymi genami. Białka próbek pobranych z hodowli komórek poszczególnych pochodnych tego szczepu przed i po indukcji ekspresji genów zmodyfikowanych endolizyn przeprowadzanej za pomocą 1 mM IPTG, analizowane były po elektroforezie w żelu SDS-PAGE, jak opisano w sekcji 5.3.11. i 5.3.13. (**Ryc. 26**). Jako kontrolę wykorzystano białka komórek szczepu *E. coli* BL21 z "pustym" plazmidem. W próbkach hodowli zawierających wklonowane geny widoczny był

dodatkowy prążek odpowiadający białku o wielkości ok. 37 kDa, zgodnej z przewidzianą wielkością badanych endolizyn i wskazujący na ekspresję kodujących ich genów.



Rycina 26. Białka szczepu kontrolnego *E. coli* BL21 oraz szczepów zawierających plazmidy z wklonowanymi genami zmodyfikowanych endolizyn po rozdziale w żelu poliakrylamidowym z SDS-em próbek pobranych z zaindukowanych hodowli trzech transformantów. Ścieżka 1 – kontrola (próbka z indukowanej hodowli *E. coli* BL21 z plazmidem bez wstawki); ścieżki 2, 3 i 4 – odpowiednio transformanty z wklonowanymi genami zmodyfikowanych endolizyn fagów J5a (TR J3), F16Ba (TR F2) i z1a (TR z2); M - marker wielkości Perfect Tricolor Protein Ladder (EurX, Gdańsk, Polska). W próbkach 2-4 widoczny jest dodatkowy prążek świadczący o obecności genu kodującego zmodyfikowaną endolizynę w każdej z próbek, którego wysokość wskazano czarną strzałką. Przewidywaną wielkość lizyn bez peptydu sygnałowego i z His-tagiem oszacowano na ponad 37 kDa.

Pozostałe prace obejmujące oczyszczanie otrzymanych białek rekombinowanych oraz badanie ich aktywności lizycznej prowadzono już tylko dla dwóch zmodyfikowanych lizyn – lizyny pochodzącej z faga J5a oraz z faga F16Ba, którym od tej pory nadano nazwy LysJ oraz LysF.

6.3.3. Oczyszczanie zmodyfikowanych endolizyn LysJ i LysF

Na **Ryc. 27** pokazano rozdział w żelu poliakrylamidowym próbek pobranych z frakcji otrzymywanych kolejno w procesie oczyszczania lizyn LysJ i LysF na złożach niklowych.



Rycina 27. Przykłady obrazów żeli SDS-PAGE z rozdziałem kolejnych frakcji białkowych w procesie oczyszczania zmodyfikowanych endolizyn LysJ (**a**) i LysF (**b**). Ścieżka 1 - kontrola (indukowana hodowla *E. coli* BL21 z plazmidem bez wstawki); ścieżka 2 - lizat bakteryjny przed nałożeniem na kolumnę niklową; ścieżka 3 - przesącz lizatu przez kolumnę; ścieżka 4 - pierwsza frakcja płukania; ścieżka 5 - druga frakcja płukania; ścieżka 6 - pierwsza frakcja elucji; ścieżka 7 - druga frakcja elucji; ścieżka 8 - trzecia frakcja elucji; M - marker wielkości Perfect Tricolor Protein Ladder.

Po przeprowadzeniu dializy oraz zagęszczania za pomocą kolumn Amicon, otrzymano skoncentrowane preparaty lizyn LysJ i LysF (**Ryc. 28**), które, po określeniu ich stężenia, poddawano ocenie aktywności litycznej.



Rycina 28. Obrazy żeli poliakrylamidowych przedstawiające oczyszczone i zagęszczone zmodyfikowane lizyny LysJ (**a**) i LysF (**b**). Marker wielkości Perfect Tricolor Protein Ladder.

Reakcja Western Blotting potwierdziła otrzymanie pożądanych białek. Barwna reakcja w postaci pojawienia się brązowych prążków po umieszczeniu membrany PVDF w mieszaninie buforu DAB i substratu dla peroksydazy chrzanowej wskazała na obecność białek z etykietką His-tag w badanych próbkach na wysokości białka o masie cząsteczkowej zgodnej z przewidzianą masą cząsteczkową oczyszczonych zmodyfikowanych lizyn (**Ryc. 29**).



Rycina 29. Obraz zmodyfikowanych lizyn LysJ (**a**) i LysF (**b**) w membranie PVDF po elektrotransferze z żelu SDS-PAGE oraz detekcji w reakcji z przeciwciałami penta His HRP Conjugate metodą Western Blotting. Widoczny ciemnobrązowy prążek na wysokości białka o masie ok. 37 kDa. Marker wielkości Perfect Tricolor Protein Ladder.

6.4. Ocena aktywności litycznej zmodyfikowanych endolizyn LysJ i LysF

6.4.1. Zymogram

Aktywność enzymatyczną otrzymanych lizyn LysJ i LysF wobec ściany komórkowej szczepu *B. anthracis* 34F2 potwierdzono w zymogramie, otrzymując przejaśnienia żelu na wysokości białek o masie ok. 37 kDa, odpowiadającej przewidzianej masie badanych lizyn (**Ryc. 30**).



Rycina 30. Obraz przejaśnień w zymogramie wskazujący na działanie zmodyfikowanych lizyn LysJ i LysF wobec ściany komórkowej szczepu *B. anthracis* 34F2. Marker wielkości Perfect Tricolor Protein Ladder.

6.4.2. Metoda płytkowa

Po kilkugodzinnej inkubacji płytki dwuwarstwowej ze szczepem *B. anthracis* 34F2 z nakroplonymi roztworami lizyny LysJ o różnych stężeniach (0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0 mg/ml), zaobserwowano w miejscach wszystkich nakropleń strefę przejaśnienia w warstwie komórek bakterii świadczącą o lizie komórek. Zgodnie z oczekiwaniami, przejaśnienie było najlepiej widoczne w miejscach nakropleń o wyższych stężeniach lizyny, jednak aktywność odnotowano również przy minimalnym stężeniu, tj. 0,05 mg/ml (**Ryc. 31a**). Po 72 godz. przechowywania płytki w temp. 4 °C średnica stref znacznie się powiększyła, co świadczyło o dyfundowaniu lizyny w głąb murawki bakteryjnej (**Ryc. 31b**). Nakroplenie PBS nie dało strefy przejaśnienia (nie pokazano).



Rycina 31. Strefy przejaśnienia w murawce *B. anthracis* 34F2 na skutek działania zmodyfikowanej lizyny LysJ o różnych stężeniach po ok. 6 godz. (**a**) i 72 godz. (**b**).

Obecność stref przejaśnienia na murawce szczepu *B. anthracis* 34F2 odnotowano po kilku godzinach inkubacji również na płytce dwuwarstwowej z nakroploną lizyną LysF, jednak tylko przy dwóch najwyższych z użytych stężeń (stosowano stężenia: 0,1, 0,25 i 0,4 mg/ml) (**Ryc. 32**). Nakroplenie PBS nie dało strefy przejaśnienia. Strefy nie powiększyły się po dłuższym czasie przechowywania płytki, jak w przypadku pierwszej badanej lizyny.



Rycina 32. Strefy przejaśnienia w murawce *B. anthracis* 34F2 na skutek działania zmodyfikowanej lizyny LysF o różnych stężeniach po ok. 4 godz. Przejaśnienia widoczne przy najwyższych stężeniach białka – 250 i 400 µg/ml.

Lizynę LysJ nakraplano na warstwy komórek pięciu zjadliwych szczepów laseczki wąglika w zakresie stężeń 0,1-2,0 mg/ml. Po kilku godzinach inkubacji obserwowano powstanie widocznych stref przejaśnienia na warstwie każdego ze szczepów w miejscach nakropleń lizyny o stężeniach 0,5-2,0 mg/ml oraz słabiej widocznej strefy przy stężeniu 0,25 mg/ml. Obserwację prowadzono w sumie przez ok. 8 godzin. Lizyna LysF stosowana była w zakresie stężeń 0,1-0,4 mg/ml i w badanych warunkach dała po czterech godzinach inkubacji bardzo delikatne przejaśnienie na szczepie PZH przy maksymalnym stężeniu, a względem pozostałych szczepów zjadliwych nie zaobserwowano jej aktywności.

Pozostałe szczepy użyte w badaniach były oceniane pod kątem wrażliwości na badane lizyny o stęż. 0,1 mg/ml każda. Na warstwie komórek żadnego ze szczepów nie zaobserwowano pojawiania się strefy przejaśnienia po ich nakropleniu, zarówno po kilku, jak i po 24 godzinach.

6.4.3. Redukcja gęstości optycznej zawiesin komórek szczepów B. anthracis

W wyniku działania dwóch badanych lizyn zaobserwowano zależny od ich stężenia spadek gęstości optycznej zawiesiny bakteryjnej szczepu *B. anthracis* 34F2. Do tego doświadczenia zastosowane były różne stężenia końcowe lizyn LysJ i LysF, odpowiednio 3,125-100 μ g/ml i 3,125-50 μ g/ml. Lizyna LysJ okazała się mieć wyższą aktywność. Przy maksymalnym stężeniu (100 μ g/ml) powodowała prawie 45% zmniejszenie gęstości optycznej hodowli (OD₆₃₀) po 10 min. inkubacji (**Ryc. 33a**), a skuteczność jej działania dla trzech najwyższych użytych stężeń (25-100 μ g/ml) była podobna w całym okresie trwania badania. Minimalnym stężeniem dającym niewielki, ale zauważalny spadek OD było stężenie 3,125 μ g/ml. W przypadku lizyny LysF, najskuteczniejsze okazało się być stężenie 50 μ g/ml zmniejszające OD o prawie 50% po 15 min. badania. Stężenia 3,125-6,25 μ g/ml były niewystarczające do uzyskania efektu działania tego białka (**Ryc. 33b**).



Rycina 33. Wpływ zmodyfikowanych lizyn LysJ (**a**) i LysF (**b**) na gęstość optyczną komórek niezjadliwego szczepu *B. anthracis* 34F2. Lizyny dodawano do zawiesiny bakterii zawieszonych w 20 mM Tris-HCl, pH 8,0. Zawiesina bakterii z dodatkiem 1x stężonego PBS zamiast białka służyła jako kontrola negatywna (0 μg/ml).

W przypadku pięciu zjadliwych szczepów *B. anthracis* zaobserwowano, że w badanych warunkach obydwa białka wyraźnie zmniejszały gęstość optyczną zawiesin komórek bakteryjnych w czasie 45 min. trwania doświadczenia, średnio z wartości OD ~0,45-0,5 do wartości ~0,15-0,2, przy czym nieco lepsze rezultaty uzyskano dla lizyny LysJ (**Ryc. 34, 35**).



Rycina 34. Wpływ zmodyfikowanej lizyny LysJ na gęstość optyczną zawiesin komórek zjadliwych szczepów *B. anthracis.* Lizynę dodawano do zawiesiny bakterii w 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 w dwóch stężeniach, 25 i 50 µg/ml. Zawiesina bakterii z dodatkiem 1x stężonego PBS zamiast białka służyła jako kontrola negatywna (0 µg/ml).



Rycina 35. Wpływ zmodyfikowanej lizyny LysF na gęstość optyczną zawiesin komórek zjadliwych szczepów *B. anthracis.* Lizynę dodawano do zawiesiny bakterii zawieszonych w 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 w jednym stężeniu, 50 µg/ml. Zawiesina bakterii z dodatkiem 1x stężonego PBS zamiast białka służyła jako kontrola negatywna (0 µg/ml).

6.4.4. Redukcja gęstości optycznej zawiesin komórek wybranych szczepów z rodzaju Bacillus niezaliczanych do gatunku B. anthracis

W przypadku szczepów gatunków *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *Bacillus* sp. *Ba 813*+ oraz jednego szczepu *Bacillus subtilis* użytych do oceny działania litycznego LysJ oraz LysF, uzyskano bardzo zróżnicowane wyniki, niespecyficzne gatunkowo. Początkowa gęstość optyczna zawiesin wszystkich szczepów wynosiła według pomiaru w czytniku płytek 96-dołkowych ok. 0,4 i w czasie 45 min. prowadzenia odczytów spadała maksymalnie do wartości ok. 0,1. Dla części szczepów obserwowano bardzo szybkie działanie lizyn, objawiające się znacznym spadkiem gęstości optycznej już po kilku minutach od ich dodania. Część szczepów była niewrażliwa na działanie badanych lizyn w warunkach eksperymentu. Liczba szczepów, w przypadku których można jednoznacznie stwierdzić spadek gęstości optycznej po działaniu lizyn (umiarkowany lub znaczący), to: 6 z 10 szczepów *B. cereus*, 9 z 10 szczepów *B. thuringiensis*, 7 z 10 szczepów przejściowych *Bacillus* sp. *Ba 813*+, 1 z 2 szczepów

B. mycoides oraz szczep B. subtilis. Poniżej zamieszczono wykresy ze średnimi i najlepszymi wynikami, pokazujące największą redukcję OD₆₃₀ zawiesin komórek różnych szczepów (**Ryc.** 36), natomiast pozostałe wykresy umieszczono w ZAŁĄCZNIKACH (Zał. 5).



105



Rycina 36. Wpływ zmodyfikowanych lizyn LysJ i LysF na gęstość optyczną zawiesin komórek wybranych szczepów z rodzaju *Bacillus*. Lizyny dodawano indywidualnie do hodowli bakterii zawieszonych w 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, do uzyskania stężenia końcowego 50 µg/ml. Zawiesina bakterii z dodatkiem 1x stężonego PBS zamiast białka służyła jako kontrola negatywna (0 µg/ml). Na każdym wykresie przedstawiono wyniki działania uzyskane dla obydwu lizyn.

6.5. Analiza sekwencji aminokwasowych zmodyfikowanych endolizyn LysJ i LysF

Porównanie sekwencji aminokwasowych lizyn LysJ i LysF za pomocą narzędzia BLASTp wykazało, że są one w 94,3% identyczne. Jednak niektóre różniące się fragmenty sekwencji obydwu lizyn zawierają reszty aminokwasowe o bardzo różnych właściwościach (**Ryc. 37**), co sugeruje, że właśnie te różnice moga odpowiadać za różnice w aktywności litycznej lub specyficzności obydwu białek. Na przykład reszty aminokwasowe seryny (S) w pozycjach 252 i 300 LysJ, w odpowiadających im pozycjąch sekwencji aminokwasowej LysF sa zastąpione przez reszty aminokwasowe proliny (P), a reszta aminokwasowa proliny w pozycji 239 LysJ w odpowiadajacej jej pozycji LysF jest zastapiona reszta aminokwasowa glutaminy (O). Z kolej mała hydrofobowa reszta aminokwasowa alaniny (A) w pozycji 231 LysJ, w odpowiadającej jej pozycji LysF jest zastąpiona przez resztę dużego aminokwasu aromatycznego, tryptofanu (W). Większość różnic w obrębie sekwencji aminokwasowej jest zlokalizowana w C-końcowej domenie skróconych wariantów obydwu lizyn, tj. za 170-tą resztą aminokwasową (Ryc. 37). Porównanie przewidzianych struktur drugorzędowych LysJ i LysF przy pomocy programu HHpred pokazało, że niektóre różnice w sekwencjach aminokwasowych obydwu białek skorelowane są z lokalnymi różnicami w ich strukturach drugorzędowych. Na Ryc. 37 zaznaczono struktury helis alfa oraz beta-kartek odpowiadające poszczególnym rejonom sekwencji obydwu lizyn.

LysJ LysF	1 1	DRILIIPDLPKQGYRNGVGAYEGVVAHSTATPEAPAINIQRYETRTWRSAFVHYAVDWDE DRVLIIPDLPKQGYRNGVGAYEGVVAHSTATPEAPAINIQRYETRTWRSAFVHYAVDWDE e eee eEeeee hheeeeee HHH	60 60
LysJ LysF	61 61	heeeeeEEEEEeeehhHhhhHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	120 120
LysJ LysF	121 121	HHHHHHH GLWTHDDVRKYLGGTTHTDPLDYLKKHGVSEAQFRADVKRAYNNTDISIPEQPSKPAEKP GLWTHDDVRKYLGGTTHTDPLDYLKKHGISDAQFRADVKRAYNNTGISIPEQPSKPAEKP HHHHHHH HHHHHHH	180 180
LysJ LysF	181 181	ee eEEEEEeeeeee HHHHHh hh ee ee hh hee hh hee hh TANVEGVAYIEGYNVNLRKGPDASYSVIRQLNKPEAYKVWGEKEGWLNLGADQWVKYNPS TANVEGVAYIEGYNVNLRKGPDASYSVIRQLNKPEAYKVWGEKDGWLNLGWNQWVKYNQS ee eEEEEEeeeee HHHHHh hh ee ee HHHHhe hh	240 240
LysJ LysF	241 241	h eeEe HHHhhhh eeeee EEeee hhh eeEeEEe EEEEEE e YIRFEKKEAVSSVAGKRVVSKVNNLRFYSAPSWEDKYVAGTVDTGLGFTIDATVTVNGSS YIRFEKKEAVSPVSVKRVVSKVNNLRFYSAPSWEDKYVAGTVDVGLGFTIDASVMVNGSP eEeEee hhhhhhhe eeeee hhh eeeeEEEee eEEeeEEEe	300 300
LysJ LysF	301 301	eeEEE eEEEee eEEE QYKVHNSKGTTYYITANEAYVYVK 324 QYKVHNSKGTTYYITASEAYVYVK 324 eEEe eEEEE eeEE	

Rycina 37. Porównanie sekwencji pierwszo- i drugorzędowych zmodyfikowanych endolizyn LysJ i LysF. Pokazano porównanie sekwencji aminokwasowych obydwu lizyn na podstawie wyników BLASTp. Liczby po bokach oznaczają zakres reszt aminokwasowych. Kolorem czerwonym zaznaczono różniące się reszty aminokwasowe. Na podstawie wyników HHpred oznaczono kolorem granatowym struktury beta-kartki (E), a kolorem zielonym

struktury helis alfa (H). Puste rejony pomiędzy nimi obejmują strukturę *coiled coil* tworzoną przez dwie lub więcej wzajemnie zwiniętych helis alfa. Wielkie i małe litery wskazują odpowiednio wysoką i niską pewność przewidywania [58].

6.6. Porównanie zakresu działania zmodyfikowanych endolizyn LysJ i LysF ze specyficznością kodujących je bakteriofagów J5a i F16Ba

W badaniu metodą płytkową zakres działania bakteriobójczego lizyny LysJ otrzymanej w postaci oczyszczonego preparatu białkowego okazał się być tożsamy z zakresem działania faga J5a, z którego pochodziła. Zakres działania lizyny i faga był specyficzny i ograniczony wyłącznie do szczepów *B. anthracis* (wszystkie badane szczepy zjadliwe oraz bezotoczkowy szczep Sterne 34F2). W tym samym badaniu, w warunkach eksperymentu, zakres działania lizyny LysF był węższy, niż zakres faga F16Ba. Nakroplenie lizyny na zjadliwe szczepy wąglika dało lekkie przejaśnienie jedynie na jednym z nich, natomiast szczep *B. anthracis* 34F2 był wrażliwy zarówno na działanie faga, jak i jego lizyny.

W badaniu redukcji gęstości optycznej zawiesin szczepów otrzymano jednak wyniki odmienne od uzyskanych metodą płytkową, które świadczyły o działaniu litycznym dwóch badanych lizyn również na komórki szczepów rodzaju *Bacillus*, nienależących do *B. anthracis*. Wyniki te (patrz **Ryc. 36**; **Zał. 6**) pozwalają stwierdzić, iż dla obydwu badanych lizyn ich zakres działania jest większy, niż fagów, z których pochodzą.
7. DYSKUSJA

Alarmujący wzrost oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe w połączeniu z brakiem innowacji w dziedzinie antybiotyków spowodował ponowne zainteresowanie opracowywaniem alternatywnych terapii zwalczających infekcje bakteryjne. Terapia fagowa okazała się być skuteczna w bardzo wielu udokumentowanych historycznych oraz współczesnych przypadkach. Fagoterapia daje nadzieje na bardziej skuteczną i bezpieczną walkę z zakażeniami bakteryjnymi, szczególnie wywołanymi przez antybiotykooporne bakterie. Zakażenia wywoływane przez groźne patogeny, jak np. laseczkę wąglika, *Bacillus anthracis*, mogą bez podjęcia natychmiastowego leczenia prowadzić do poważnych problemów zdrowotnych lub nawet śmierci. Antybiotykoterapia w tym przypadku może być szczególnie długotrwała i obciążająca dla organizmu. Zasadne wydaje się zatem prowadzenie badań mających na celu opracowywanie i wdrażanie alternatywnych dla antybiokoterapii strategii leczenia infekcji *Bacillus anthracis*, takich jak np. fagoterapia.

Wszystkie bakteriofagi mogące potencjalnie znaleźć zastosowanie w przemyśle gałęziach pokrewnych, wymagają bardzo medycznym czy dokładnego zbadania i scharakteryzowania ich biologii oraz sekwencji genomu. W niniejszej pracy przedstawiono podstawową biologiczną charakterystykę oraz analizę genomową trzech nowych fagów specyficznych wobec Bacillus anthracis — J5a, F16Ba i z1a. Wykazano, że wraz z wyizolowanymi niedawno fagami B. anthracis: Carmel SA, Negev SA i Tavor SA tworzą one nowy klad fagów (nazwany kladem J5a), który można na podstawie kryterium podobieństwa genomowego zaklasyfikować do rodzaju Wbetavirus, wraz z historycznymi fagami waglikowymi: Wbeta, Fah, Cherry i trzema izolatami Gamma. Wszystkie te fagi są blisko spokrewnione z prototypowym fagiem tego rodzaju, lizogennym fagiem Wbeta. Wszystkie wymienione fagi, wraz z fagiem AP631, cechują się zbliżoną wielkością genomu, oscylującą między 36 615 bp a 40 867 bp. Jedną z ich wspólnych cech jest również zakończenie DNA jednoniciowymi fragmentami o identycznej sekwencji (CGCCGCCCC) na końcu 5' (sekcja 6.2.2; [55, 126]). Minimalne i maksymalne wartości podobieństwa sekwencji DNA między wspomnianymi sześcioma historycznymi fagami wynoszą odpowiednio 89,3% i 99,1%, natomiast podobieństwo sekwencji DNA nowych opisanych izolatów względem 10-ciu pozostałych fagów mieści się w zakresie od 69,4% (Gamma izolat 53 vs. z1a) do 97,1% (Carmel_SA vs. F16Ba) (Ryc. 20).

W celu scharakteryzowania biologicznych właściwości nowych fagów początkowo zbadano ich zakres gospodarza. Liczba szczepów gospodarza, które zwyczajowo należy

przebadać jest po części funkcją różnorodności gatunków docelowych [86]. Niektóre bakterie są bardzo zróżnicowane zarówno pod względem struktur powierzchniowych, jak i wrażliwości na fagi, jednak gatunki takie jak B. anthracis czy Yersinia pestis są bardziej homogenne genetycznie [96], a zatem odpowiednio mniejsza liczba szczepów bakterii może wymagać przetestowania. Wśród 41 wykorzystanych szczepów bakteryjnych, fagi J5a, F16Ba i z1a wykazały aktywność lityczną wyłącznie przeciwko szczepom B. anthracis (pięć badanych szczepów). Szczep B. subtilis oraz inne badane szczepy z grupy B. cereus (36 szczepów) okazały się niewrażliwe na te fagi. Zakres gospodarza ma istotny wpływ na użyteczność faga do stosowania w terapii fagowej. Zakres ograniczony do jednego gatunku jest pożądany, ponieważ nie zagraża reszcie mikrobiomu gospodarza [86]. Warto w tym miejscu wspomnieć, iż wysoce specyficzny, flagowy fag B. anthracis - Gamma - oprócz B. anthracis jest również zdolny do infekowania kilku szczepów B. cereus [151, 170, 177]. Z tego względu WHO sugeruje, aby w celu identyfikacji lub detekcji szczepów wywołujących wąglik, faga Gamma nie stosować jako jedynego narzędzia diagnostycznego, ale wykorzystywać go w połączeniu z innymi testami [178]. Również fag Fah, który jest bardzo podobny do faga Wbeta, był namnażany na szczepie B. cereus [126]. W przypadku innych fagów laseczki wąglika podobnych do Wbeta: Cherry, Negev SA, Carmel SA i Tavor SA brak jest szczegółowych informacji na temat szczepów bakteryjnych użytych do sprawdzenia ich zakresu gospodarza. Jeżeli przy użyciu większej kolekcji izolatów z grupy B. cereus, w tym służących do namnażania niektórych fagów kladu Wbeta, można by było potwierdzić specyficzność fagów J5a, F16Ba i z1a wyłacznie przeciwko szczepom B. anthracis, nowe fagi, po usunięciu ich modułów lizogenicznych (patrz sekcja 6.2.5.), mogłyby być uznane za lepsze od faga Gamma w wykrywaniu izolatów B. anthracis. Specyficzna aktywność opisanych przeze mnie nowych fagów wobec B. anthracis byłaby ich istotną zaletą.

Bakterie gatunków *B. anthracis* oraz *B. cereus* cechują się tym samym typem strukturalnym peptydoglikanu, A1γ [54, 159]. Jest jednak kilka cech odróżniających te szczepy od siebie. Cztery główne właściwości *B. cereus* odróżniające je od *B. anthracis* to: zdolność do ruchu, zdolność do hemolizy, oporność na penicylinę oraz brak otoczki [148]. Odnotowano co prawda istnienie otoczkowego szczepu *B. cereus*, jednak o innej budowie otoczki niż otoczka wąglikowa [173]. Otoczka z kwasu poli-γ-D-glutaminowego *B. anthracis*, wraz z toksyną obrzękową i letalną, jest specyficznym czynnikiem wirulencji tego patogenu. Są jednak szczepy *B. cereus*, jak RSVF1 (ATCC 4342), które wykazują podobną jak szczepy *B. anthracis* wrażliwość na faga Gamma oraz jego lizynę PlyG. Sugeruje się, że szczep RSVF1 może być szczepem *B. anthracis* pozbawionym swoich plazmidów wirulencji [164]. Stąd cechy strukturalne peptydoglikanu zidentyfikowane dla szczepu RSVF1 najprawdopodobniej reprezentują również cechy peptydoglikanu ściany komórkowej wysoce monomorficznych izolatów *B. anthracis* [97, 153]. Ten fakt może tłumaczyć rozszerzenie zakresu działania specyficznych wąglikowych fagów i ich lizyn o niektóre nieliczne szczepy *B. cereus*.

Poza specyficznością względem gospodarza, istotna dla działania i potencjalnego użycia fagów jest ich stabilność w różnych warunkach środowiska. Wartość pH oraz temperatura otoczenia to jedne z kluczowych czynników wpływających na stabilność fagów. Temperatura wpływa również na możliwość przyłączania fagów do komórek bakteryjnych, ich penetracji oraz namnażania, a także na kinetykę tych procesów [90]. Fagi J5a, F16Ba i z1a zachowywały wysoką stabilność w zakresie temperatur 20-50 °C, a wysokie miana infekcyjnych cząstek tych fagów uzyskiwano w szerokim zakresie pH (3-11), co świadczy też o ich dużej odporności na zmiany kwasowości środowiska. Dla porównania, duży myofag HSE3 specyficzny wobec szczepów *B. cereus, B. anthracis* i *B. thuringiensis*, opisywany przez autorów jako wysoce stabilny w różnych pH i temperaturach, utrzymywał w podobnych warunkach najwyższe miano tylko w zakresie pH 5-7, a tolerowane przez niego temperatury bez istotnego wpływu na aktywność nie przekraczały 37 °C [143]. Inny opisany niedawno myofag infekujący szczepy *B. cereus* i *B. thuringiensis*, Sam46, zachowywał stabilność w zakresie pH 5-10, również węższym, niż fagi J5a, F16Ba i z1a opisane w tej pracy [95].

Analiza krzywych jednostopniowego wzrostu (OSG) fagów J5a, F16Ba oraz z1a ujawniła ich trzy różne okresy latencji (odpowiednio 35, 25 i 30 min.) i zbliżone wielkości plonu wirionów potomnych (odpowiednio 20, 16,5 i 17 PFU). Nie ma wystarczających danych obejmujących stabilność pH/termiczną oraz parametry jednostopniowego wzrostu innych fagów infekujących specyficznie szczepy *B. anthracis*. Wyniki otrzymane dla kilku myowirusów z dużymi genomami infekujących wiele szczepów z grupy *B. cereus* były znacząco różne i charakteryzowały się dużymi wartościami plonów (90-300 PFU) oraz czasami latencji na poziomie 60-90 min. [45, 107]. Plony cząstek potomnych fagów J5a, 16FBa i z1a okazały się znacznie mniejsze, jednak fagi te potrzebują znacznie mniej czasu na uwolnienie potomstwa, a tym samym zniszczenie zainfekowanej komórki bakteryjnej. Wykazana tolerancja na szeroki zakres temperatur i pH oraz krótki okres latencji przemawiają za możliwą przydatnością tych fagów jako środków do zwalczania zakażeń laseczką wąglika. Opracowanie koktajlu fagowego wykazującego działanie bakteriobójcze wobec większości szczepów *B. anthracis* jest uważane za najbardziej optymalny i najbardziej perspektywiczny środek w walce z tą bakterią [88].

Ważnym elementem strukturalnym większości fagów jest złożony, wielobiałkowy ogonek pośredniczący w przyłączaniu się do bakterii, penetracji jej ściany komórkowej oraz

wstrzykiwaniu materiału genetycznego [81]. Zidentyfikowane białka ogonków nowo opisanych fagów zostały w tej pracy porównane z podobnymi do nich na poziomie sekwencji i przewidzianych struktur białkami ogonka innych fagów. Pierwszym etapem, który określa zakaźność danego faga względem bakterii jest jego zdolność do rozpoznawania i wiązania się z tą bakterią, a w przypadku fagów ogonkowych w interakcję tę zaangażowane są dystalne elementy ogonka. Wcześniejsze badania doprowadziły do identyfikacji białka Gp14 faga Gamma i odpowiadającego mu białka Wp14 faga Wbeta jako białek wiażących receptor na komórkach B. anthracis [162]. Oczyszczone Gp14 wiązało się z komórkami B. anthracis i zachowywało tę zdolność po połaczeniu z białkiem fluorescencyjnym [17, 162]. Przeszukanie bazy danych struktur białek z użyciem programu HHpred pod kątem identyfikacji białek podobnych do białek ogonka wbetawirusów przeprowadzone w ramach tej pracy pozwoliło sklasyfikować białko Gp14 i jego odpowiedniki w innych fagach rodzaju Wbeta jako białka dystalne ogonka (Dits) oraz zidentyfikować u tych fagów przypuszczalne drugie białko wiążące receptor (RBP), określone w pracy jako Tal/RBP i kodowane odpowiednio przez geny gp15 w fagu Gamma i wp15 w fagu Wbeta. Triada białek składająca sią z tzw. miarki ogonka (TMP, od ang. tape-measure protein), Dit i Tal (Tal/RBP) jest zakonserwowana w dystalnych częściach ogonka siphofagów, jakkolwiek ten wspólny układ może zawierać różne rozszerzenia funkcjonalne [69]. Dodatkowo przypisanie funkcji Dit i Tal/RBP białkom kodowanym przez geny wbetawirusów, które znajdują się bezpośrednio za genem białka TMP jest spójne z organizacją genów kodujących białka o tych funkcjach w genomach niektórych innych siphowirusów. W przypadku wbetawirusów organizacja tych genów wydaje się być najbardziej podobna do ich organizacji w genomie faga *Bacillus* SPP1, gdzie Tal/RBP jest kodowane przez pojedynczy gen. Białko Dit w wbetawirusach jest jednak większe niż jego odpowiednik u faga SPP1 (496 aa vs. 253 aa) [7]. Zwiększony rozmiar tego pierwszego można przypisać obecności w jego centralnym regionie modułu podobnego do drugiego modułu wiążącego reszty cukrowe (CBM2, od ang. carbohydrate binding module 2) białka Dit faga Lactobacillus J-1 (aa 368-614 w J-1 Dit) [40]. Białka Dit zawierające wewnętrzną domenę (domeny) CBM i reprezentujące zmodyfikowane w ewolucji warianty Dit są częściami ogonków fagowych niektórych siphofagów infekujących bakterie Gram-dodatnie, w tym fagów Lactobacillus [40], fagów Lactococcus [40] i fagów Streptococcus [79, 106], odpowiedzialnymi za rozpoznawanie gospodarza i adsorpcję do jego komórek. Wyniki analizy przeprowadzonej w ramach tej pracy wskazują, że są one również składnikami ogonka wirusów podobnych do Wbeta.

Najbardziej dystalną częścią ogonka faga Wbeta i fagów podobnych do Wbeta, w tym opisanych w tej pracy fagów J5a, F16Ba i z1a, jest długie centralne włókno (kolec) ogonka (**Ryc.**

12a) (patrz także [126, 162]), podobne do tego z faga Bacillus TP21-L z gatunku Lwoffvirus TP21 [101]. Musi być ono produktem genu, który został wcześniej zidentyfikowany jako kodujący jedno z białek strukturalnych (minor structural protein) (J5a_015 w J5a) [126, 162]. Analiza podobieństw przewidzianej struktury tego białka z wykorzystaniem HHpred oraz bazy struktur białkowych wykazała, że odpowiada ono białkom Tal/RBP niektórych innych siphowirusów, ale ma strukturę mozaikową. Jego region N-końcowy jest podobny do Nkońcowego regionu białka Tal/RBP faga 80alfa Staphylococcus aureus, domena centralna nie wykazuje znaczącego podobieństwa strukturalnego do jakichkolwiek białek o znanej strukturze, podczas gdy domena C-końcowa jest podobna do wewnątrzcząsteczkowych białek opiekuńczych włókien ogonka lub kolców ogonka fagów bakterii Gram-ujemnych. Te białka opiekuńcze zostały zidentyfikowane w niedojrzałych włóknach ogonka i białkach kolców ogonka ewolucyjnie odległych fagów [60]. Są one niezbędne do prawidłowej trimeryzacji i fałdowania ich natywnych białek, a po autokatalitycznym odcięciu odsłaniają centralne domeny tych białek wiążące receptor lub mające aktywność depolimeraz egzopolisacharydów. Siphofagi bakterii Gram-dodatnich wiążące się do receptorów białkowych mają proste, centralne włókno ogonka bezpośrednio przymocowane do ogonka lub do płytki podstawnej [53]. Jako receptor dla faga Gamma na powierzchni komórek B. anthracis zidentyfikowane zostało wcześniej białko GamR (Gamma phage receptor), kotwiczone w ścianie komórkowej za pomocą enzymu sortazy [38]. Nie jest ono białkiem związanym z resztami cukrowymi, co wskazuje, że wiąże się z nim nie białko Dit fagów rodzaju Wbeta, które ma powinowactwo do tych reszt, a właśnie białko Tal/RBP tych fagów. Białko Dit fagów rodzaju Wbeta powinno zatem wiązać niezidentyfikowane reszty cukrowe na powierzchni komórek B. anthracis. Chociaż wykazano, że Gp14 faga Gamma (zidentyfikowane w tej pracy jako Dit) wiąże B. anthracis i wrażliwe komórki B. cereus, nie badano, czy Gp14 wiąże się z GamR, czy z innymi receptorami gospodarza. Zauważono, że podczas gdy białka Dit wbetawirusów, jak również N- i C-końcowe domeny białek Tal/RBP są prawie identyczne, centralne domeny Tal/RBP są wysoce zróżnicowane (Zał. 6). Nie można zatem wykluczyć, że receptor białkowy nie jest taki sam dla wszystkich tych fagów.

Poza zbadaniem biologii nowych fagów ważną częścią tej pracy była analiza ich genomów oraz porównanie ich z genomami innych opisanych do tej pory podobnych fagów infekujących *B. anthracis*. Jak wspomniano wcześniej, jednym z efektów tej analizy był podział 13-stu badanych fagów rodzaju *Wbetavirus* na dwa klady, klad J5a oraz klad Wbeta, skupiające fagi o podobnych proteomach. Jakkolwiek okazało się, że wzór podobieństwa sekwencji między funkcjonalnie spokrewnionymi produktami tych genów, które różnią się znacznie sekwencją

w poszczególnych fagach w kilku przypadkach nie jest specyficzny dla kladu (Ryc. 22, Zał. 3, 4). Sytuacja taka dotyczy m. in. genów tzw. systemu arbitrium. Ostatnie badania wykazały, że podczas infekcji komórki niektóre fagi komunikują się za pomocą sygnału peptydowego w ramach systemu zwanego arbitrium, w celu kontrolowania decyzji o rozpoczęciu lizogenii [4]. Nie jest przy tym jasne, czy komunikacja ta może również służyć do zapoczątkowania rozwoju litycznego fagów w lizogenach, znanego jako indukcja profagów [4]. System arbitrium oraz systemy podobne do niego zostały zidentyfikowane w fagach wielu gatunków bakterii, z których większość to patogenne i bytujące w glebie bakterie rodzaju Bacillus [172]. Różnice sekwencji aminokwasowej w receptorze feromonowym AimR systemu arbitrium i jego specyficznym feromonie peptydowym AimP sugerują, iż specyficzność tego systemu u czterech fagów kladu J5a (J5a, z1a, Carmel_SA i Tavor_SA) jest inna niż u dwóch pozostałych fagów tego kladu i wszystkich łagodnych fagach kladu Wbeta. Różnice w obrębie fagów należacych do jednego kladu zaobserwowano również w przypadku miejscowo-specyficznej rekombinazy, enzymu uczestniczącego w integrowaniu się DNA łagodnego faga z genomem bakterii [70]. Sekwencja aminokwasowa tego białka, jak również sekwencje DNA krótkich regionów przed i za genami rekombinazy, sa bardzo podobne w trzech fagach kladu J5a (J5a, z1a i Tavor SA), ale różnią się od odpowiednich sekwencji pozostałych wbetafagów, które sa do siebie bardzo podobne. Można przypuszczać, że rekombinazy tych dwóch typów rozpoznają różne miejsca przyłączenia w genomach swoich gospodarzy.

Bez wątpienia bardzo ważnym elementem rozróżniającym dwa wydzielone klady są specyficzne dla nich moduły lizy komórek bakteryjnych. Podczas gdy fagi z kladu Wbeta kodują identyczną kanoniczną endolizynę o długości 233 aa i holinę klasy III o długości 141 aa, fagi kladu J5a kodują endolizyny o długości 351 aa z peptydem sygnałowym oraz dwa krótsze białka o cechach holin. Większość endolizyn nie zawiera sekwencji sygnałowych, umożliwiających przedostanie się enzymu do przestrzeni peryplazmatycznej [51]. Zazwyczaj są one kumulowane w cytoplazmie i pokonują drogę do peptydoglikanu w sposób zależny od holin [3]. Obecność SP zapewnia ukierunkowany transport lizyn przez błonę cytoplazmatyczną z udziałem bakteryjnego systemu sekrecyjnego – *sec* [50]. Jak się jednak okazuje, wszystkie badane fagi prezentujące niekanoniczny system sekrecji endolizyn, tj. kodujące lizynę z peptydem sygnałowym, wciąż kodują również białka holinopodobne [26, 56, 157, 161]. Wytłumaczeniem tego stanu rzeczy jest konieczność ograniczenia przedwczesnej aktywności lizyn i tym samym przedwczesnej lizy komórki bakteryjnej, a określanie i utrzymywane właściwego czasu lizy jest właśnie kluczową rolą holin [48]. Obecność w fagach kladu J5a dwóch genów kodujących holiny jest jego charakterystyczną cechą. Zaangażowanie więcej niż jednej holiny w lizę komórek zostało już

opisane w przypadku niektórych innych fagów [76, 117, 131]. Może to ułatwiać fagom lizę komórek rosnących w różnych warunkach lub komórek różnych gospodarzy fagowych [48]. Endolizyny fagów kladu Wbeta i przewidywane endolizyny fagów kladu J5a to amidazy N-acetylomuramylo-L-alaniny (**Tabele 7-9**; [99, 164]). Przeprowadzone analizy wykazały, że różnica wielkości między tymi lizynami jest związana z różnicą w długości ich domen CBD (od ang. *cell-binding domain*) wiążących ścianę komórkową (~75 aa vs. 159 aa) oraz z obecnością peptydu sygnałowego (SP) w tych ostatnich. Obecność tego peptydu w lizynach fagów kladu J5a wskazuje na różnice w mechanizmie transportu lizyn przez błonę cytoplazmatyczną u tych fagów w stosunku do fagów kladu Wbeta. Endolizyny syntetyzowane w postaci prebiałek z peptydem sygnałowym i transportowane przez błonę cytoplazmatyczną do ściany komórkowej szlakiem zależnym od SecA, z jednoczesnym usunięciem SP [65, 156] są kodowane przez niektóre fagi bakterii Gram-dodatnich.

Częścią endolizyn fagów bakterii Gram-dodatnich odpowiedzialną za specyficzne działanie tych enzymów dzięki zdolności do wiązania specyficznych ligandów w ścianie komórkowej bakterii, np. białek, cukrów, czy kwasów lipotejchojowych są ich domeny CBD [113]. Dowiedziono, że C-końcowa domena CBD najlepiej poznanej lizyny wąglikowej, PlyG z faga Gamma, o długości 78 reszt aminokwasowych, wiąże się specyficznie z drugorzędowymi polisacharydami ściany komórkowej (SCWP, od ang. *secondary cell wall polysaccharides*) *B. anthracis* [57, 59]. Lizyna ta może specyficznie zabijać komórki *B. anthracis* oraz innych członków klastra *B. anthracis*, tj. RSVF1 (streptomycynooporny *B. cereus* 4342) i *B. cereus* ATCC 10987 [164]. Lizyna J5a najprawdopdobniej również może się wiązać z ligandem polisacharydowym, jak wynika z podobieństwa jej przewidywanej struktury CBD do struktur CBD tych lizyn, które zawierają dwie kopie powtórzeń struktury tzw. beta-beczułki podobnej do spotykanych w strukturach SH3b, takich jak CBD lizyny Ply500. W przypadku lizyny Ply500 wykazano jej specyficzne i silne wiązanie do ligandów cukrowych w ścianie komórkowej *Listeria* [103, 193]. Wyjaśnienie czy podobne ligandy mogą być rozpoznawane i wiązane przez lizyny kladu PlyG i J5a, wymaga dalszych badań.

W obrębie odcinka położonego w fagach rodzaju *Wbetavirus* na prawo od genów modułu lizy bakterii oraz genu kodującego rekombinazę znajdują się geny modułu kontroli lizogenii. Moduł ten został dokładnie przeanalizowany w przypadku modelowego faga Wbeta [162]. Ówczesne badania pokazały, iż lityczny fag Gamma wyewoluował z łagodnego faga Wbeta w procesie obejmującym różne rekombinacje DNA, a także akumulacje mutacji punktowych oraz małych i dużych delecji. Zmiany te dotyczyły m.in. delecji dużego fragmentu o długości 2003 bp w obrębie modułu lizogenii, usuwającej większość genu represora podobnego do *cI* oraz kolejnego genu [162]. Delecja ta tłumaczy przekształcenie fenotypu lizogennego w lityczny i wyewoluowanie bezwarunkowo litycznych wariantów fagów z tego rodzaju, tj. Gamma i Cherry. U większości fagów należących do rodzaju *Wbetavirus* odnotowano obecność nienaruszonych modułów kontroli lizy-lizogenii, co wskazuje na ich lizogenny charakter, podobnie jak faga Wbeta. Fagi J5a, F16Ba i z1a zostały początkowo uznane za lityczne na podstawie zdolności do tworzenia klarownych łysinek, jednak w omawianych rejonach ich genomów również nie znaleziono wspomnianych delecji. Można im zatem również przypisać charakter lizogenny. Usunięcie odpowiednich regionów w ich genomach także powinno umożliwić uzyskanie ich obligatoryjnie litycznych pochodnych.

Konieczność wyselekcjonowania i dysponowania fagami litycznymi przestaje mieć tak istotne znaczenie, jeśli do leczenia zakażenia bakteryjnego jest rozpatrywane zastosowanie lizyn fagowych. Niezaprzeczalną ich zaletą jest to, że można jako środki terapeutyczne wykorzystać lizyny pochodzące zarówno z fagów litycznych, jak i lizogennych. Stosowanie w terapiach enzymów litycznych niesie ze sobą wiele korzyści (patrz sekcja 1.5.) oraz, co ważne, wydaje się być bezpieczniejsze niż użycie całych bakteriofagów. Mimo wielu potwierdzonych dowodów skuteczności fagoterapii w leczeniu zakażeń bakteryjnych, stosowanie "żywych" cząstek wirusów jakimi są fagi wciąż wiąże się z różnymi watpliwościami, dotyczącymi m.in. ryzyka wprowadzania obcego DNA wirusowego, możliwości przenoszenia niepożądanych genów przez fagi, odpowiedzi immunologicznej, czy wykształcania mechanizmów odporności [130]. Należy podkreślić, że nie odnotowano do tej pory wykształcania mechanizmów oporności bakterii na lizyny fagowe. Wykorzystanie endolizyn przeciwko infekcjom bakteryjnym in vivo zostało wdrożone już na początku XXI wieku. W 2001 roku Nelson i wsp. opublikowali pierwszy raport opisujący wyniki badań nad możliwością profilaktycznego zastosowania endolizyny faga C1, nazwaną później PlyC, w modelu in vivo przeciwko zakażeniom górnych dróg oddechowych paciorkowcem z grupy A [133]. Następnie Loeffler i wsp. opublikowali nowatorski artykuł na temat zastosowania endolizyny Cpl-1 faga Cp-1 drogą dożylną przeciwko bakteriemii pneumokokowej [112]. Od tamtego czasu wiele uwagi i badań poświęca się w celu charakteryzowania i opracowywania nowych lizyn przeznaczonych do walki z różnymi patogenami. Otrzymane wyniki wskazują na wysoki potencjał terapeutyczny zarówno fagów, jak i wyizolowanych i zmodyfikowanych endolizyn w walce przeciwko chorobotwórczym bakteriom.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań aktywności bakteriobójczej dwóch zmodyfikowanych lizyn nowych fagów *B. anthracis*, tj. lizyn LysJ i LysF z fagów J5a i F16Ba, otrzymanych w postaci oczyszczonych białek. Mimo dużego podobieństwa sekwencji DNA genów kodujących te lizyny, kodowane przez nie produkty okazały się mieć nieco różny stopień aktywności wobec szczepów *Bacillus* użytych w badaniach. Może to wynikać z różnic w sekwencjach aminokwasowych tych białek oraz różnic, które odnotowano w ich przewidzianej strukturze drugorzędowej (**Ryc. 37**), choć ciekawym jest, iż większość tych ostatnich zlokalizowana jest w C-końcowej domenie CBD, a nie w domenie katalitycznej. Wymienione w WYNIKACH (sekcja 6.5.) zamiany reszt aminokwasowych mogą prowadzić do powstawania istotnych różnic w strukturze przestrzennej białek, jak np. usztywnienia struktury.

Pierwszą różnicę w aktywności enzymatycznej obydwu lizyn zaobserwowano w zymogramie, gdzie przy użyciu takich samych stężeń lizyna LysJ dała zdecydowanie mocniejsze przejaśnienie w żelu zawierającym preparat ściany komórkowej *B. anthracis* 34F2. W kolejnych etapach badań aktywność białek była oceniana poprzez ich nakraplanie na płytki z warstwą różnych szczepów bakteryjnych oraz za pomocą oceny stopnia redukcji gęstości optycznej zawiesin bakteryjnych. Podobnie jak fagi J5a i F16Ba, lizyny LysJ i LysF nie dawały stref przejaśnienia w warstwach komórek bakterii z gatunków *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* oraz *B. subtilis*, natomiast obie były aktywne względem szczepów *B. anthracis*, co sugerowało początkowo tożsamy zakres gospodarza fagów oraz pochodzących z nich lizyn. Lizyna LysJ wykazała jednak wyższy poziom aktywności wobec szczepu gospodarza oraz szerszy zakres działania wobec zjadliwych szczepów laseczki wąglika niż LysF. Dłuższe czasy inkubacji nie wpływały na polepszenie rezultatów w przypadku płytek, na których nie obserwowano pojawiania się stref przejaśnienia mimo, iż metoda płytkowa pomiaru aktywności litycznej wydaje się być bardziej czuła wraz z wydłużaniem czasu inkubacji [47].

Nieco odmienne wyniki otrzymano w metodzie oceny redukcji gęstości optycznej (OD) zawiesin bakteryjnych. Zarówno w przypadku szczepu gospodarza, *B. anthracis* 34F2, jak i wszystkich pięciu badanych szczepów wąglikowych (211, PZH, 1153, 1583, 1584) odnotowano wyraźny spadek OD zawiesin komórek w czasie trwania doświadczenia wywołany przez każdą z lizyn. Obydwa enzymy znacznie redukowały gęstość zawiesin komórek szczepu *B. anthracis* 34F2 nawet w bardzo niskich stężeniach i znacznie niższych niż te zastosowane do nakraplania na murawkę bakteryjną, tj. 6 µg/ml dla LysJ i 12,5 µg/ml dla LysF (**Ryc. 33**). Spadki OD zawiesin zjadliwych szczepów *B. anthracis* następowały jednak później niż w zawiesinie izolatu szczepionkowego. Być może przyczyną tego opóźnionego działania jest obecność otoczki w tych pierwszych, gdzie reszty kwasu poli- γ -D-glutaminowego mogą utrudniać kontakt lizyn ze ścianą komórkową. Szczepionkowy *B. anthracis* 34F2 pozbawiony jest plazmidu pXO2 kodującego przede wszystkim geny tej otoczki, uwrażliwiając go na fagocytozę w zakażonym organizmie. Dodatkowo okazało się, że wbrew spodziewanym wynikom, ok. 2/3 z 33 badanych

szczepów z innych gatunków rodzaju Bacillus niż B. anthracis również było wrażliwe na działanie obydwu lizyn w w testach z wykorzystaniem tej metody. Co wydaje się interesujące w przypadku rozbieżności wyników uzyskanych dla tych szczepów dwiema badanymi metodami, nie były one skorelowane z przynależnością gatunkową poszczególnych szczepów. Z badanej puli największy odsetek tych, w przypadku których gęstość optyczna ulegała zmniejszeniu, stanowiły szczepy z gatunku B. thuringiensis. Warto zauważyć, iż obydwie lizyny były aktywne również wobec bakterii B. subtilis, gatunku spoza grupy B. cereus. Zakres gospodarzy lizyn LysJ i LysF wyraźnie przewyższył zatem zakres gospodarzy fagów, z których pochodzą. Podobnych obserwacji dokonywano niejednokrotnie w przypadku innych lizyn, również tych pochodzących z fagów infekujących szczepy Bacillus. Endolizyny nierzadko charakteryzują się szerszym zakresem gospodarza niż fagi, wciąż jednak ze względu na swoją specyficzność działają tylko na określone patogeny, nie powodując lizy komórek innych bakterii mikroflory [1]. Spektrum wiązania przez domeny CBD lizyn w wielu przypadkach obejmuje cały rodzaj bakterii, jak zbadano na przykład w przypadku znakowanych białkiem GFP (od ang. green fluorescent protein) domen SH3b gronkowcowych lizyn, co wskazuje na ich zdolność rozpoznawania bardziej konserwatywnego ligandu w komórkach bakterii [71]. Schuch i wsp. opublikowali wyniki badań nad lizyną PlyB z faga BcpI B. cereus. Wykazali jej działanie lityczne wobec wszystkich użytych szczepów z gatunków B. anthracis, B. cereus, B. thuringiensis, B. mycoides oraz B. megaterium, podczas gdy sam fag był aktywny tylko wobec nielicznych szczepów spośród wymienionych gatunków lub nie działał na żadne szczepy z danego gatunku [165]. Podobnie, lizyny z fagów infekujących bakterie z grupy B. cereus, lizyna PlyB221 z faga Deep-Blue i lizyna PlyP32 z faga Deep-Purple, wykazały w badaniach znacznie szerszy zakres specyficzności w porównaniu z ich macierzystymi fagami [109].

Łatwo dostrzegalne różnice w wynikach badań nad aktywnością lizyn przeprowadzonych metodą nakropleniową w agarze stałym oraz w hodowlach płynnych sugerują istnienie czynników determinujących dostępność peptydoglikanu dla lizyn w różnych warunkach hodowli. Komórki *B. anthracis* na płytkach z LA pochodziły z gęstych całonocnych hodowli prowadzonych w bulionie LB. Testy sprawdzające zdolność lizyn do obniżania gęstości optycznej w czasie prowadzone zaś były z użyciem komórek zawieszonych w 20 mM Tris-HCl po uprzedniej kilkugodzinnej hodowli w bulionie. Można przypuszczać, iż komórki w trakcie badań znajdowały się w różnych fazach wzrostu, tj. odpowiednio w fazie stacjonarnej oraz fazie wykładniczej. Komórki *B. anthracis* mają na swojej powierzchni dwie struktury, które nie występują u wszystkich bakterii, a mianowicie warstwę S (S-layer, od ang. *surface layer*) i otoczkę, a w istocie bardzo niewiele bakterii posiada oba te elementy struktury jednocześnie

[54]. Warstwa S całkowicie pokrywa komórkę ponad warstwą peptydoglikanu i jest zbudowana z dwóch głównych białek, Sap i EA1, kodowanych przez chomosomalne geny. Białka te są kodowane sekwencyjne, a białko Sap jest kodowane jako pierwsze [125]. Dowiedziono, że białko Sap tworzy warstwę S podczas początkowej oraz logarytmicznej fazy wzrostu bakterii i jest ona bardziej uporządkowana i elastyczna [35]. Z kolei podczas wczesnej fazy stacjonarnej w warstwie S zaczynają być obecne białkowe sieci tworzone przez obydwa białka, Sap oraz EA1. Sieć białkowa zbudowana z białka EA1 tworzy drobniejszą kratownicę z usieciowaniem zorientowanym w różnych kierunkach [36]. Te cechy budowy osłon bakteryjnych mogły mieć wpływ na otrzymanie różnych wyników przeprowadzonych w niniejszej pracy badań. Co ciekawe, obecność warstwy S nie jest konieczna do standardowego otoczkowania szczepów *B. anthracis*, a jednocześnie białko Sap jest kodowane przez różne szczepy zjadliwe, jak też bezplazmidowe szczepy *B. anthracis* [54].

W przypadku lizyn LysJ i LysF metoda oceny aktywności lizyn poprzez redukcję OD płynnych hodowli okazała się bardziej czuła niż użycie płytek z podłożem stałym. Wyniki uzyskiwane dla lizyn za pomocą obydwu omawianych metod nie zawsze jednak kształtują się według takiego schematu. Etobayeva i wsp. odnotowali odwrotną sytuację w przypadku lizyn Bacillus PlyP56 i PlyN74, które nie powodowały lizy zawiesin komórek szczepów laseczki waglika 34F2, Ames35 i UM23, ale dawały wyraźne przejaśnienia na płytkach z warstwa komórek dwóch ostatnich izolatów [47]. Brak efektu w postaci redukcji OD tych szczepów skutkował uznaniem tych enzymów przez badaczy jako enzymów o stosunkowo słabej aktywności. Opierając się tym wniosku można zatem zdobyć się na stwierdzenie, iż, mimo że wyniki aktywności bakteriobójczej dla lizyn LysJ i LysF uzyskane metodą nakraplania na płytki nie były tożsame i nie dały zadowalających efektów na szczepach zjadliwych B. anthracis w przypadku LysF, ich ogólne właściwości lityczne można uznać za dosyć silne biorąc pod uwagę ich zdolność do znacznego zmniejszania gęstości optycznej wielu z badanych szczepów bakteryjnych, w tym wszystkich szczepów wąglika. Nowe lizyny, a w szczególności LysJ, są więc dobrymi kandydatami do dalszych badań w zakresie bardziej szczegółowego określenia ich właściwości i skuteczności pod kątem możliwego przyszłego zastosowania. Przedstawiona w niniejszej pracy charakterystyka trzech nowych fagów laseczki wąglika oraz dwóch pochodzących z nich endolizyn stanowi wkład w poszerzanie wiedzy na temat biologii fagów rodzaju Wbetavirus oraz ich enzymów litycznych, jak też ich możliwego zastosowania. Możliwości wykorzystywania fagów w medycynie i dziedzinach lub aplikacjach pokrewnych, jak detekcja czy diagnostyka są niezaprzeczalne. W walce z wielolekoopornymi szczepami bakteryjnymi (MDR, od ang. multidrug resistant bacteria), które mogą być użyte przez

terrorystów jako czynniki broni biologicznej (BWA, od ang. *biowarfare agent*), fagi mogą stanowić potencjalne narzędzie do ich biokontroli [167]. Zarówno fagi, jak i pochodzące z nich endolizyny mogą również znajdować zastosowanie w testach identyfikacji i wykrywania szczepów *B. anthracis*.

Dodatkowo możliwym dezynfekcja ważnym obszarem zastosowania jest i dekontaminacja. W odróżnieniu od chemicznych dezynfektantów, fagowe enzymy lityczne nie angażują użycia toksycznych związków, co czyni jest bezpieczniejszą alternatywą [16]. Dezynfekcja abiotycznych powierzchni wykorzystuje zazwyczaj środki przeciwdrobnoustrojowe o szerokim spektrum, ponieważ selektywność nie jest tak kluczowa, co jednak może wpływać na nabywanie oporności przez bakterie. Lizyny mogą zwykle działać w podobnych warunkach, jednak tylko na wybrane patogeny, ograniczając ryzyko wykształcania oporności [16]. Lizyny fagowe okazały się również skuteczne w zwalczaniu spor, gdy były podane ze związkami, które wstępnie prowadziły do kiełkowania lub niszczenia ich osłonki. Na przykład lizyna PlyPH badana pod kątem degradacji spor B. anthracis poddanych uprzednio działaniu proteazy (proteinazy K) w celu naruszenia osłonki przetrwalników oraz lizozymu i enzymów SleB w celu zaindukowania kiełkowania prowadziła do skutecznego niszczenia tych spor [129]. Stosowanie lizyn fagowych razem z induktorami kiełkowania powinno być rozważane w procesie opracowywaniu środka, który mógłby być stosowany zarówno w celu dekontaminacji powierzchni, jak też do walki z BWA [16]. Takie naturalne "terapeutyki", którymi mogą być fagi oraz ich lityczne enzymy, są zdecydowanie przyjaźniejsze środowisku oraz tańsze w produkcji. Mimo braku odpowiednich regulacji co do klinicznego zastosowania oraz potrzeby uświadamiania ludzi na temat istnienia, właściwości i możliwego wykorzystania tych bakteriobójczych wirusów, co może być uznawane za główne utrudnienia, podejmowanie działań w celu pokonywania tych przeszkód wydaje się być niewielkim wysiłkiem wobec możliwych zysków. Dodatkowo w społeczeństwie coraz bardziej rośnie świadomość potrzeby szukania i stosowania bardziej ekologicznych i naturalnych rozwiązań radzenia sobie np. z zanieczyszczeniami środowiska, a takie problemy na dużą skalę mogłoby być wygenerowane przez celowe użycie laseczki waglika. Poszukiwanie alternatywnych metod zwalczania zakażeń powinno zatem skupiać uwagę badaczy w stosunku do B. anthracis, jak i innych patogenów zagrażających życiu lub zdrowiu ludzi i zwierząt.

8. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

- 1. Trzy nowe fagi, J5a, F16Ba i z1a, wyizolowane z trzech różnych miejsc w Polsce, są specyficzne wyłącznie wobec szczepów *B. anthracis* spośród wszystkich szczepów użytych w badaniach.
- Fagi J5a, F16Ba i z1a są przedstawicielami nowych gatunków w obrębie rodzaju Wbetavirus.
- Zaproponowano podział fagów z rodzaju Wbetavirus na dwa klady, klad J5a (grupujący fagi J5a, F16Ba i z1a, Negev_SA, Carmel_SA i Tavor_SA) oraz klad Wbeta obejmujący pozostałe fagi, co koreluje z różnicami między proteomami fagów reprezentujących każdy klad.
- 4. Nowe fagi odznaczają się dużą odpornością na zmiany pH oraz temperatury.
- 5. Geny fagów J5a, F16Ba i z1a kodujące ich endolizyny (N-acetylomuramylo-L-Alaamidazy) zostały sklonowane i poddane ekspresji w komórkach *E. coli*.
- Produkty dwóch z tych genów, endolizynę faga J5a (LysJ) i faga F16Ba (LysF), otrzymano w postaci oczyszczonych preparatów białkowych.
- 7. Badanie aktywności litycznej otrzymanych białek metodą płytkową dało lepsze wyniki dla lizyny LysJ.
- 8. Metoda badania aktywności litycznej za pomocą oceny redukcji gęstości optycznej zawiesin bakteryjnych okazała się bardziej czuła od metody płytkowej i wykazała znaczącą aktywność lityczną obydwu lizyn wobec większości szczepów użytych w badaniach.
- 9. Zakres gospodarza lizyn LysJ i LysF okazał się szerszy niż fagów, z których pochodzą.

9. UPOWSZECHNIANIE WYNIKÓW I FINANSOWANIE BADAŃ

Upowszechnianie wyników badań opisanych w niniejszej rozprawie:

- 1. Publikacje oryginalne:
 - Opublikowane: Nakonieczna, A., Rutyna, P., Fedorowicz, M., Kwiatek, M., Mizak, L., & Łobocka, M. (2022). Three Novel Bacteriophages, J5a, F16Ba, and z1a, Specific for Bacillus anthracis, Define a New Clade of Historical Wbeta Phage Relatives. Viruses, 14(2), 213.
 - W przygotowaniu: Nakonieczna A., Łobocka M. New phage endolysins, LysJ and LysF, with the potential to control Bacillus anthracis infections.
- 2. <u>Zamieszczenie sekwencji genomów trzech nowych bakteriofagów w publicznej bazie</u> <u>danych GenBank:</u>
 - Bacillus phage J5a, complete genome numer akcesyjny GenBank MT745955;
 - Bacillus phage F16Ba, complete genome numer akcesyjny GenBank MT745954;
 - *Bacillus* phage z1a, complete genome numer akcesyjny GenBank MT745956.
- 3. Doniesienia plakatowe:
 - "Wstępna charakterystyka endolizyn kodowanych przez dwa nowe fagi Bacillus anthracis, J5a i F16Ba"; A. Nakonieczna, M. Łobocka. Sympozjum Bakteriofagowe, Gdańsk, 8-10.09.2022 r.
 - "Characterization of three novel Bacillus anthracis lytic phages"; A. Nakonieczna, M. Korba, P. Rutyna, L. Mizak, M. Łobocka. Konferencja międzynarodowa: The Biology of Anthrax. Bari, Włochy, 03-06.09.2019 r.
 - "Attempt to analyze the similarity of the sequences of endolysins genes of new phages lytic against Bacillus anthracis"; A. Nakonieczna, M. Łobocka, L. Mizak, R. Gryko, P. Rutyna.

Konferencja międzynarodowa: EMBO Workshop on Viruses of Microbes 2018, Wrocław, 09-13.07.2018 r.

"Comparative analysis of new Bacillus anthracis phages and their lytic enzymes";
 A. Nakonieczna, M. Łobocka, L. Mizak, R. Gryko, P. Rutyna.
 Konferencja międzynarodowa: 5th World Congress on Targeting Infectious Diseases: Targeting Phage & Antibiotic Resistance, Florencja, Włochy, 17-18.05.2018 r.

Finansowanie badań:

- Badania zostały w pełni sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu PRELUDIUM "Analiza porównawcza endolizyn kodowanych przez bakteriofagi lityczne wobec laseczek wąglika" (nr 2016/23/N/NZ7/01992) – kierownik i wykonawca projektu.
- Projekt Komisji Europejskiej "Anthrax Environmental Decontamination Network" or 'AEDNet' - International Research Staff Exchange Scheme (IRSES) - Marie Curie Actions (PIRSES-GA-2013-612309) umożliwił pozyskanie części próbek środowiskowych do badań w kierunku poszukiwania nowych fagów – wykonawca projektu.

10. BIBLIOGRAFIA

- 1. Abdelrahman, F., Easwaran, M., Daramola, O. I., Ragab, S., Lynch, S., Oduselu, T. J., ... & El-Shibiny, A. (**2021**). Phage-encoded endolysins. *Antibiotics*, 10(2), 124.
- 2. Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1(2), 66-85.
- Adamczyk-Popławska, M., Tracz-Gaszewska, Z., Lasota, P., Kwiatek, A., & Piekarowicz, A. (2020). *Haemophilus influenzae* HP1 Bacteriophage Encodes a Lytic Cassette with a Pinholin and a Signal-Arrest-Release Endolysin. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4013.
- Aframian, N., Omer Bendori, S., Kabel, S., Guler, P., Stokar-Avihail, A., Manor, E., ... & Eldar, A. (2022). Dormant phages communicate via arbitrium to control exit from lysogeny. *Nature Microbiology*, 7(1), 145-153.
- 5. Alibek, K. (**2002**). Research considerations for better understanding of biological threats, In Forum on emerging infections: Biological threats and terrorism. Assessing the science and response capabilities. Workshop Summary Institute of Medicine, 63–65.
- 6. Alkalay, S., Sternberg, S., Coppenhagen-Glazer, S., & Hazan, R. (**2018**). Complete genome sequences of three *Bacillus anthracis* bacteriophages. *Genome Announcements*, 6(1), e01164-17.
- Alonso, J. C., Lüder, G., Stiege, A. C., Chai, S., Weise, F., & Trautner, T. A. (1997). The complete nucleotide sequence and functional organization of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. *Gene*, 204(1-2), 201-212.
- 8. Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W16-W21.
- Arroyo-Moreno, S., Cummings, M., Corcoran, D. B., Coffey, A., & McCarthy, R. R. (2022). Identification and characterization of novel endolysins targeting *Gardnerella vaginalis* biofilms to treat bacterial vaginosis. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 8(1), 1-12.
- 10. Athamna, A., Athamna, M., Abu-Rashed, N., Medlej, B., Bast, D. J., & Rubinstein, E. (2004). Selection of *Bacillus anthracis* isolates resistant to antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(2), 424-428.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., ... & Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9(1), 1-15.
- 12. Baillie, L. (2001). The development of new vaccines against *Bacillus anthracis*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(4), 609-613.
- 13. Baj, J; Markiewicz, Z. (2012). Biologia molekularna bakterii. PWN. Warszawa, 460.
- Baptista, C., Santos, M. A., & Sao-José, C. (2008). Phage SPP1 reversible adsorption to *Bacillus* subtilis cell wall teichoic acids accelerates virus recognition of membrane receptor YueB. *Journal* of *Bacteriology*, 190(14), 4989-4996.

- 15. Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 340(4), 783-795.
- Bhagwat, A., Mixon, M., Collins, C. H., & Dordick, J. S. (2020). Opportunities for broadening the application of cell wall lytic enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(21), 9019-9040.
- Braun, P., Wolfschläger, I., Reetz, L., Bachstein, L., Jacinto, A. C., Tocantins, C., ... & Grass, G. (2020). Rapid microscopic detection of *Bacillus anthracis* by fluorescent receptor binding proteins of bacteriophages. *Microorganisms*, 8(6), 934.
- Briers, Y., Walmagh, M., Van Puyenbroeck, V., Cornelissen, A., Cenens, W., Aertsen, A., ... & Lavigne, R. (2014). Engineered endolysin-based "Artilysins" to combat multidrug-resistant gramnegative pathogens. *MBio*, 5(4), e01379-14.
- 19. Brown, E. R., & Cherry, W. B. (1955). Specific identification of *Bacillus anthracis* by means of a variant bacteriophage. *The Journal of Infectious Diseases*, 34-39.
- Buhr, T. L., Young, A. A., Minter, Z. A., Wells, C. M., & Shegogue, D. A. (2011). Decontamination of a hard surface contaminated with *Bacillus anthracis*∆Sterne and *B. anthracis* Ames spores using electrochemically generated liquid-phase chlorine dioxide (eClO2). *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), 1057-1064.
- 21. Büttner, F. M., Zoll, S., Nega, M., Götz, F., & Stehle, T. (2014). Structure-function analysis of *Staphylococcus aureus* amidase reveals the determinants of peptidoglycan recognition and cleavage. *Journal of Biological Chemistry*, 289(16), 11083-11094.
- Buttner, M. P., Cruz, P., Stetzenbach, L. D., Klima-Comba, A. K., Stevens, V. L., & Cronin, T. D. (2004). Determination of the efficacy of two building decontamination strategies by surface sampling with culture and quantitative PCR analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4740-4747.
- 23. Callewaert, L., Walmagh, M., Michiels, C. W., & Lavigne, R. (**2011**). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 164-171.
- Canter, D. A., Gunning, D., Rodgers, P., O'connor, L., Traunero, C., & Kempter, C. J. (2005). Remediation of *Bacillus anthracis* contamination in the US Department of Justice mail facility. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science*, 3(2), 119-127.
- 25. Carlson, K. (2005). Appendix. Working With Bacteriophages: Common Techniques And Methodological Approaches. Box 2: Electron Microscopy. In Bacteriophages: biology and applications; Kutter, E., Sulakvelidze, A., Eds.; Boca Raton, FL, CRC Press.
- 26. Catalao, M. J., Gil, F., Moniz-Pereira, J., Sao-Jose, C., & Pimentel, M. (**2013**). Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(4), 554-571.
- 27. Ceuppens, S., Boon, N., & Uyttendaele, M. (2013). Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology*, 84(3), 433-450.
- 28. Chambers, J.; Mathai, J.K. (2019). Anthrax infection. *StatPearls*.

- 29. Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., & Hanage, W. P. (**2015**). Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be?. *Evolutionary Applications*, 8(3), 240-247.
- 30. Chang, Y. (**2020**). Bacteriophage-derived endolysins applied as potent biocontrol agents to enhance food safety. *Microorganisms*, 8(5), 724.
- 31. Chang, Y., Kim, M., & Ryu, S. (2017). Characterization of a novel endolysin LysSA11 and its utility as a potent biocontrol agent against *Staphylococcus aureus* on food and utensils. *Food Microbiology*, 68, 112-120.
- Chatuev, B. M., & Peterson, J. W. (2010). Analysis of the sporicidal activity of chlorine dioxide disinfectant against *Bacillus anthracis* (Sterne strain). *Journal of Hospital Infection*, 74(2), 178-183.
- 33. Clokie, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31-45.
- 34. Contreras-Moreira, B., & Vinuesa, P. (**2013**). GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24), 7696-7701.
- Couture-Tosi, E., Delacroix, H., Mignot, T., Mesnage, S., Chami, M., Fouet, A., & Mosser, G. (2002). Structural analysis and evidence for dynamic emergence of *Bacillus anthracis* S-layer networks. *Journal of Bacteriology*, 184(23), 6448-6456.
- 36. Cowles, K. N., & Goodrich-Blair, H. (2005). Expression and activity of a *Xenorhabdus nematophila* haemolysin required for full virulence towards *Manduca sexta* insects. *Cellular Microbiology*, 7(2), 209-219.
- 37. Cowles, P. B. (1931). A bacteriophage for B. anthracis. Journal of Bacteriology, 21(3), 161-166.
- Davison, S., Couture-Tosi, E., Candela, T., Mock, M., & Fouet, A. (2005). Identification of the Bacillus anthracis γ phage receptor. Journal of Bacteriology, 187(19), 6742-6749.
- 39. Del Sol, F. G., Penades, J. R., & Marina, A. (2019). Deciphering the molecular mechanism underpinning phage arbitrium communication systems. *Molecular Cell*, 74(1), 59-72.
- 40. Dieterle, M. E., Spinelli, S., Sadovskaya, I., Piuri, M., & Cambillau, C. (**2017**). Evolved distal tail carbohydrate binding modules of *Lactobacillus phage* J-1: a novel type of anti-receptor widespread among lactic acid bacteria phages. *Molecular Microbiology*, 104(4), 608-620.
- 41. Doganay, M., & Metan, G. (2009). Human anthrax in Turkey from 1990 to 2007. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(2), 131-140.
- 42. Domenech, M., García, E., & Moscoso, M. (**2011**). In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9), 4144-4148.
- 43. Dong, S., Zhang, S., Sun, J. et al (**1979**) Isolation and identification of *Bacillus anthracis* phage AP631. *Acta Microbiologica Sinica*, 19(2), 218–219.

- 44. Dragon, D. C., & Rennie, R. P. (**1995**). The ecology of anthrax spores: tough but not invincible. *The Canadian Veterinary Journal*, 36(5), 295.
- El-Arabi, T. F., Griffiths, M. W., She, Y. M., Villegas, A., Lingohr, E. J., & Kropinski, A. M. (2013). Genome sequence and analysis of a broad-host range lytic bacteriophage that infects the *Bacillus cereus* group. *Virology Journal*, 10(1), 1-11.
- Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., ... & Sorek, R. (2017). Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. *Nature*, 541(7638), 488-493.
- Etobayeva, I., Linden, S. B., Alem, F., Harb, L., Rizkalla, L., Mosier, P. D., ... & Nelson, D. C. (2018). Discovery and biochemical characterization of PlyP56, PlyN74, and PlyTB40—*Bacillus* specific endolysins. *Viruses*, 10(5), 276.
- 48. Fernandes, S., & São-José, C. (**2016**). More than a hole: The holin lethal function may be required to fully sensitize bacteria to the lytic action of canonical endolysins. *Molecular Microbiology*, 102(1), 92-106.
- 49. Fernandes, S., & São-José, C. (2017). Probing the function of the two holin-like proteins of bacteriophage SPP1. *Virology*, 500, 184-189.
- 50. Fernandes, S., & São-José, C. (**2018**). Enzymes and mechanisms employed by tailed bacteriophages to breach the bacterial cell barriers. *Viruses*, 10(8), 396.
- 51. Fischetti, V. A. (2005). Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends in Microbiology*, 13(10), 491-496.
- 52. Fischetti, V. A. (**2010**). Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(6), 357-362.
- 53. Fokine, A., & Rossmann, M. G. (**2014**). Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage*, 4(2), e28281.
- 54. Fouet, A., & Mesnage, S. (2002). Bacillus anthracis cell envelope components. Anthrax, 87-113.
- Fouts, D. E., Rasko, D. A., Cer, R. Z., Jiang, L., Fedorova, N. B., Shvartsbeyn, A., ... & Gill, S. R. (2006). Sequencing *Bacillus anthracis* typing phages gamma and cherry reveals a common ancestry. *Journal of Bacteriology*, 188(9), 3402-3408.
- 56. Frias, M. J., Melo-Cristino, J., & Ramirez, M. (2009). The autolysin LytA contributes to efficient bacteriophage progeny release in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 191(17), 5428-5440.
- 57. Fujinami, Y., Hirai, Y., Sakai, I., Yoshino, M., & Yasuda, J. (**2007**). Sensitive Detection of *Bacillus anthracis* Using a Binding Protein Originating from γ-Phage. *Microbiology and Immunology*, 51(2), 163-169.
- Gabler, F., Nam, S. Z., Till, S., Mirdita, M., Steinegger, M., Söding, J., ... & Alva, V. (2020). Protein sequence analysis using the MPI bioinformatics toolkit. Current Protocols in *Bioinformatics*, 72(1), e108.

- 59. Ganguly, J., Low, L. Y., Kamal, N., Saile, E., Forsberg, L. S., Gutierrez-Sanchez, G., ... & Kannenberg, E. L. (**2013**). The secondary cell wall polysaccharide of *Bacillus anthracis* provides the specific binding ligand for the C-terminal cell wall-binding domain of two phage endolysins, PlyL and PlyG. *Glycobiology*, 23(7), 820-832.
- Garcia-Doval, C., Castón, J. R., Luque, D., Granell, M., Otero, J. M., Llamas-Saiz, A. L., ... & Van Raaij, M. J. (2015). Structure of the receptor-binding carboxy-terminal domain of the bacteriophage T5 L-shaped tail fibre with and without its intra-molecular chaperone. *Viruses*, 7(12), 6424-6440.
- 61. Garneau, J. R., Depardieu, F., Fortier, L. C., Bikard, D., & Monot, M. (**2017**). PhageTerm: a tool for fast and accurate determination of phage termini and packaging mechanism using next-generation sequencing data. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.
- 62. Gembara, K., & Dąbrowska, K. (2021). Phage-specific antibodies. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 186-192.
- 63. Ghosh, N., Tomar, I., & Goel, A. K. (2013). A field usable qualitative anti-protective antigen enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human anthrax. *Microbiology and Immunology*, 57(2), 145-149.
- 64. Gillis, A., & Mahillon, J. (2014). Phages preying on *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: past, present and future. *Viruses*, 6(7), 2623-2672.
- Głowacka-Rutkowska, A., Ulatowska, M., Empel, J., Kowalczyk, M., Boreczek, J., & Łobocka, M. (2020). A Kayvirus distant homolog of staphylococcal virulence determinants and VISA biomarker is a phage lytic enzyme. *Viruses*, 12(3), 292.
- 66. Golais, F., Hollý, J., & Vítkovská, J. (2013). Coevolution of bacteria and their viruses. *Folia Microbiologica*, 58(3), 177-186.
- 67. Gondil, V. S., Harjai, K., & Chhibber, S. (**2020**). Endolysins as emerging alternative therapeutic agents to counter drug-resistant infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(2), 105844.
- 68. Górski, A., Borysowski, J., & Międzybrodzki, R. (2007). Bacteriophages in medicine. *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*, 125-158.
- 69. Goulet, A., Spinelli, S., Mahony, J., & Cambillau, C. (**2020**). Conserved and diverse traits of adhesion devices from *Siphoviridae* recognizing proteinaceous or saccharidic receptors. *Viruses*, 12(5), 512.
- Groth, A. C., & Calos, M. P. (2004). Phage integrases: biology and applications. *Journal of Molecular Biology*, 335(3), 667-678.
- 71. Gu, J., Lu, R., Liu, X., Han, W., Lei, L., Gao, Y., ... & Diao, Y. (2011). LysGH15B, the SH3b domain of staphylococcal phage endolysin LysGH15, retains high affinity to staphylococci. *Current Microbiology*, 63, 538-542.
- 72. Guo, Z., Lin, H., Ji, X., Yan, G., Lei, L., Han, W., ... & Huang, J. (**2020**). Therapeutic applications of lytic phages in human medicine. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104048.

- 73. Gutiérrez, D., & Briers, Y. (**2021**). Lysins breaking down the walls of gram-negative bacteria, no longer a no-go. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 15-22.
- 74. Gutierrez, D., Ruas-Madiedo, P., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (**2014**). Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. *PloS One*, 9(9), e107307.
- 75. Haddad Kashani, H., Schmelcher, M., Sabzalipoor, H., Seyed Hosseini, E., & Moniri, R. (2018). Recombinant endolysins as potential therapeutics against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: current status of research and novel delivery strategies. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(1), e00071-17.
- Halgasova, N., Ugorcakova, J., Gerova, M., Timko, J., & Bukovska, G. (2010). Isolation and characterization of bacteriophage ΦBP from *Paenibacillus polymyxa* CCM 7400. *FEMS Microbiology Letters*, 305(2), 128-135.
- 77. Hassim, A., Lekota, K. E., Van Dyk, D. S., Dekker, E. H., & Van Heerden, H. (**2020**). A unique isolation of a lytic bacteriophage infected *Bacillus anthracis* isolate from Pafuri, South Africa. *Microorganisms*, 8(6), 932.
- 78. Hausbeck, M. K., Bell, J., Medina-Mora, C., Podolsky, R., & Fulbright, D. W. (2000). Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*, 90(1), 38-44.
- Hayes, S., Vincentelli, R., Mahony, J., Nauta, A., Ramond, L., Lugli, G. A., ... & Cambillau, C. (2018). Functional carbohydrate binding modules identified in evolved dits from siphophages infecting various Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 110(5), 777-795.
- 80. Hess, K. L., & Jewell, C. M. (**2020**). Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development. *Bioengineering & Translational Medicine*, 5(1), e10142.
- 81. Hofer, U. (2016). The sting is in the phage's tail. *Nature Reviews Microbiology*, 14(8), 477-477.
- 82. Hoque, S., Farouk, B., & Haas, C. N. (2011). Development of artificial neural network based metamodels for inactivation of anthrax spores in ventilated spaces using computational fluid dynamics. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 61(9), 968-982.
- Horgan, M., Coffey, A., Ross, R. P., O'Mahony, J., Fitzgerald, G. F., & McAuliffe, O. (2008). The Use of Recombinant Phage Lysins for the Control of Bacterial Pathogens. *Patho-Biotechnology*, 187.
- 84. https://web.archive.org/web/20211031152751/ https://www.cdc.gov/anthrax/treatment/index.html. (z dnia 20.10.2022 r.).
- HuiJuan, Z., DongLi, L., Li, H., Wei, L., EnMin, Z., JianChun, W., ... & XuDong, L. (2016). Detection and identification of *Bacillus cereus* susceptible to phage AP631. *Chinese Journal of Zoonoses*, 32(6), 507-511.
- 86. Hyman, P. (**2019**). Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. *Pharmaceuticals*, 12(1), 35.

- Ibarra-Sánchez, L. A., Van Tassell, M. L., & Miller, M. J. (2018). Antimicrobial behavior of phage endolysin PlyP100 and its synergy with nisin to control *Listeria monocytogenes* in Queso Fresco. *Food Microbiology*, 72, 128-134.
- 88. Inal, J. M. (2003). Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis-English Edition-, 51(4), 237-244.
- 89. Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y. A., Resch, G., ... & Gabard, J. (2019). Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 35-45.
- 90. Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages. *Folia Microbiologica*, 56(3), 191-200.
- 91. Jończyk-Matysiak, Jończyk-Matysiak, E., Kłak, M., Weber-Dąbrowska, B., Borysowski, J., & Górski, A. (2014). Possible use of bacteriophages active against *Bacillus anthracis* and other *B. cereus* group members in the face of a bioterrorism threat. *BioMed Research International*.
- 92. Jun, S. Y., Jang, I. J., Yoon, S., Jang, K., Yu, K. S., Cho, J. Y., ... & Kang, S. H. (2017). Pharmacokinetics and tolerance of the phage endolysin-based candidate drug SAL200 after a single intravenous administration among healthy volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(6), e02629-16.
- 93. Katoh, K., & Standley, D. M. (**2013**). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780.
- 94. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059-3066.
- 95. Kazantseva, O. A., Piligrimova, E. G., & Shadrin, A. M. (**2021**). vB_BcM_Sam46 and vB_BcM_Sam112, members of a new bacteriophage genus with unusual small terminase structure. *Scientific Reports*, 11(1), 1-18.
- Keim, P., Gruendike, J. M., Klevytska, A. M., Schupp, J. M., Challacombe, J., & Okinaka, R. (2009). The genome and variation of *Bacillus anthracis*. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(6), 397-405.
- Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., ... & Hugh-Jones, M. E. (2000). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2928-2936.
- Kiefer, D., Dalantai, G., Damdindorj, T., Riehm, J. M., Tomaso, H., Zöller, L., ... & Scholz, H. C. (2012). Phenotypical characterization of Mongolian *Yersinia pestis* strains. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(3), 183-188.
- Kikkawa, H. S., Ueda, T., Suzuki, S. I., & Yasuda, J. (2008). Characterization of the catalytic activity of the γ-phage lysin, PlyG, specific for *Bacillus anthracis*. *FEMS Microbiology Letters*, 286(2), 236-240.

- 100. Kizziah, J. L., Manning, K. A., Dearborn, A. D., & Dokland, T. (**2020**). Structure of the host cell recognition and penetration machinery of a *Staphylococcus aureus* bacteriophage. *PLoS Pathogens*, 16(2), e1008314.
- 101. Klumpp, J., Calendar, R., & Loessner, M. J. (**2010**). Complete nucleotide sequence and molecular characterization of *Bacillus* phage TP21 and its relatedness to other phages with the same name. *Viruses*, 2(4), 961-971.
- 102. Kolstø, A. B., Tourasse, N. J., & Økstad, O. A. (2009). What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annual Review of Microbiology*, 63, 451-476.
- 103. Korndörfer, I. P., Danzer, J., Schmelcher, M., Zimmer, M., Skerra, A., & Loessner, M. J. (2006). The crystal structure of the bacteriophage PSA endolysin reveals a unique fold responsible for specific recognition of *Listeria* cell walls. *Journal of Molecular Biology*, 364(4), 678-689.
- 104. Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3), 567-580.
- 105. Kwiatek, M., Parasion, S., & Nakonieczna, A. (2020). Therapeutic bacteriophages as a rescue treatment for drug-resistant infections-an in vivo studies overview. *Journal of Applied Microbiology*, 128(4), 985-1002.
- 106. Lavelle, K., Goulet, A., McDonnell, B., Spinelli, S., van Sinderen, D., Mahony, J., & Cambillau, C. (2020). Revisiting the host adhesion determinants of *Streptococcus thermophilus* siphophages. *Microbial Biotechnology*, 13(6), 1765-1779.
- 107. Lee, W. J., Billington, C., Hudson, J. A., & Heinemann, J. A. (**2011**). Isolation and characterization of phages infecting *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*, 52(5), 456-464.
- 108. Leonard, T. E., Siratan, E., Hartiadi, L. Y., & Crystalia, A. A. (**2021**). Insights into antimicrobial peptides in fighting anthrax: A review. *Drug Development Research*, 82(6), 754-766.
- 109. Leprince, A., Nuytten, M., Gillis, A., & Mahillon, J. (2020). Characterization of PlyB221 and PlyP32, Two Novel Endolysins Encoded by Phages Preying on the *Bacillus cereus* Group. *Viruses*, 12(9), 1052.
- 110. Lipsitch, M., Singer, R. S., & Levin, B. R. (2002). Antibiotics in agriculture: when is it time to close the barn door? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 5752-5754.
- 111. Liu, X., Wang, D., Pan, C., Feng, E., Fan, H., Li, M., ... & Wang, H. (2019). Genome sequence of Bacillus anthracis typing phage AP631. Archives of Virology, 164(3), 917-921.
- 112. Loeffler, J. M., Djurkovic, S., & Fischetti, V. A. (2003). Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infection and Immunity*, 71(11), 6199-6204.
- 113. Loessner, M. J., & Rees, C. E. (2005). *Listeria* phages: basics and applications. *Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology*, 362-379.
- 114. Loessner, M. J., Kramer, K., Ebel, F., & Scherer, S. (2002). C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Molecular Microbiology*, 44(2), 335-349.

- 115. Lopatina, A., Tal, N., & Sorek, R. (2020). Abortive infection: bacterial suicide as an antiviral immune strategy. *Annual Review of Virology*, 7, 371-384.
- 116. Łoś, M., & Węgrzyn, G. (2012). Pseudolysogeny. Advances in Virus Research, 82, 339-349.
- 117. Lu, Z., Altermann, E., Breidt, F., & Kozyavkin, S. (2010). Sequence analysis of *Leuconostoc* mesenteroides bacteriophage Φ1-A4 isolated from an industrial vegetable fermentation. Applied and Environmental Microbiology, 76(6), 1955-1966.
- 118. Manchee, R. J., Broster, M. G., Stagg, A. J., & Hibbs, S. E. (**1994**). Formaldehyde solution effectively inactivates spores of *Bacillus anthracis* on the Scottish island of Gruinard. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11), 4167-4171.
- 119. Mäntynen, S., Laanto, E., Oksanen, H. M., Poranen, M. M., & Díaz-Muñoz, S. L. (2021). Black box of phage-bacterium interactions: exploring alternative phage infection strategies. *Open Biology*, 11(9), 210188.
- 120. Mayer, M. J., Gasson, M. J., & Narbad, A. (2012). Genomic sequence of bacteriophage ATCC 8074-B1 and activity of its endolysin and engineered variants against *Clostridium sporogenes*. *Applied And Environmental Microbiology*, 78(10), 3685-3692.
- 121. McCallin, S., Sarker, S. A., Barretto, C., Sultana, S., Berger, B., Huq, S., ... & Brüssow, H. (2013). Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects. *Virology*, 443(2), 187-196.
- 122. Meile, S., Du, J., Dunne, M., Kilcher, S., & Loessner, M. J. (**2022**). Engineering therapeutic phages for enhanced antibacterial efficacy. *Current Opinion in Virology*, 52, 182-191.
- 123. Memish, Z., Mah, M. W., Al Mahmoud, S., Al Shaalan, M., & Khan, M. Y. (2000). Brucella bacteraemia: clinical and laboratory observations in 160 patients. Journal of Infection, 40(1), 59-63.
- 124. Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Fortuna, W., Weber-Dąbrowska, B., & Górski, A. (**2006**). Terapia fagowa jako alternatywa w leczeniu zakażeń wywołanych przez bakterie antybiotykooporne. *Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska*, 3(2), 201-205.
- 125. Mignot, T., Mesnage, S., Couture-Tosi, E., Mock, M., & Fouet, A. (2002). Developmental switch of S-layer protein synthesis in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1615-1627.
- 126. Minakhin, L., Semenova, E., Liu, J., Vasilov, A., Severinova, E., Gabisonia, T., ... & Severinov, K. (2005). Genome sequence and gene expression of *Bacillus anthracis* bacteriophage Fah. *Journal of Molecular Biology*, 354(1), 1-15.
- 127. Moraru, C., Varsani, A., & Kropinski, A. M. (2020). VIRIDIC—A novel tool to calculate the intergenomic similarities of prokaryote-infecting viruses. *Viruses*, 12(11), 1268.
- 128. Morris, K. (1999). US military face punishment for refusing anthrax vaccine. *The Lancet*, 353(9147), 130.
- 129. Mundra, R. V., Mehta, K. K., Wu, X., Paskaleva, E. E., Kane, R. S., & Dordick, J. S. (2014). Enzyme-driven *Bacillus* spore coat degradation leading to spore killing. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(4), 654-663.

- 130. Murray, E., Draper, L. A., Ross, R. P., & Hill, C. (**2021**). The advantages and challenges of using endolysins in a clinical setting. *Viruses*, 13(4), 680.
- 131. Nakayama, K., Kanaya, S., Ohnishi, M., Terawaki, Y., & Hayashi, T. (1999). The complete nucleotide sequence of φCTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. *Molecular Microbiology*, 31(2), 399-419.
- 132. Nakonieczna, A., Cooper, C. J., & Gryko, R. (2015). Bacteriophages and bacteriophage-derived endolysins as potential therapeutics to combat Gram-positive spore forming bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 620-631.
- 133. Nelson, D., Loomis, L., & Fischetti, V. A. (**2001**). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7), 4107-4112.
- 134. Nguyen, C., Makkar, R., Sharp, N. J., Page, M. A., Molineux, I. J., & Schofield, D. A. (2017). Detection of *Bacillus anthracis* spores from environmental water using bioluminescent reporter phage. *Journal of Applied Microbiology*, 123(5), 1184-1193.
- Niemcewicz, M., & Bartoszcze, M. (2006). Applying macro restriction analysis and PCR in differentiating plasmid cured strains of *Bacillus anthracis* from transitional strains (*Bacillus sp. Ba* 813). *Medycyna Weterynaryjna*, 62(6), 658-662.
- 136. Niemcewicz, M., & Bartoszcze, M. (2006). Applying macro-restriction analysis in differentiating selected strains of the *Bacillus cereus* group. *Medycyna Weterynaryjna*, 62(9), 1065-1070.
- 137. Nishimura, Y., Yoshida, T., Kuronishi, M., Uehara, H., Ogata, H., & Goto, S. (**2017**). ViPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinformatics*, 33(15), 2379-2380.
- 138. Opperman, C. J., Wojno, J. M., & Brink, A. J. (2022). Treating bacterial infections with bacteriophages in the 21st century. *Southern African Journal of Infectious Diseases*, 37(1).
- 139. Paczesny, J., & Bielec, K. (2020). Application of bacteriophages in nanotechnology. *Nanomaterials*, 10(10), 1944.
- 140. Parfitt, T. (2005). Georgia: an unlikely stronghold for bacteriophage therapy. *The Lancet*, 365(9478), 2166-2167.
- 141. Park, S., Jun, S. Y., Kim, C. H., Jung, G. M., Son, J. S., Jeong, S. T., ... & Kang, S. H. (2018). Characterisation of the antibacterial properties of the recombinant phage endolysins AP50-31 and LysB4 as potent bactericidal agents against *Bacillus anthracis*. *Scientific Reports*, 8(1), 1-11.
- 142. Parreira, R., São-José, C., Isidro, A., Domingues, S., Vieira, G., & Santos, M. A. (1999). Gene organization in a central DNA fragment of *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 encoding lytic, integrative and non-essential functions. *Gene*, 226(1), 83-93.
- 143. Peng, Q., & Yuan, Y. (2018). Characterization of a novel phage infecting the pathogenic multidrugresistant *Bacillus cereus* and functional analysis of its endolysin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7901-7912.
- 144. Pilo, P., & Frey, J. (**2011**). *Bacillus anthracis*: molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution. Infection, *Genetics and Evolution*, 11(6), 1218-1224.

- 145. Porter, C. J., Schuch, R., Pelzek, A. J., Buckle, A. M., McGowan, S., Wilce, M. C., ... & Whisstock, J. C. (2007). The 1.6 Å crystal structure of the catalytic domain of PlyB, a bacteriophage lysin active against *Bacillus anthracis*. *Journal of Molecular Biology*, 366(2), 540-550.
- 146. Potter, S. C., Luciani, A., Eddy, S. R., Park, Y., Lopez, R., & Finn, R. D. (2018). HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W200-W204.
- 147. Priest, F. G., Barker, M., Baillie, L. W., Holmes, E. C., & Maiden, M. C. (2004). Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *Journal of Bacteriology*, 186(23), 7959-7970.
- 148. Prod'hom G., Bille J. (**2010**). Chapter 167 Aerobic Gram-positive bacilli. In: Infectious Diseases (Third Edition). Vol. 2, 1660-1675.
- 149. Quiberoni, A.; Suárez, V. B.; Binetti, A. G.; Reinheimer, J. A. (2011). "BACTERIOPHAGE | Biological Aspects", in Fuquay, John W. (ed.), Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), San Diego: Academic Press, 430–438, ISBN 978-0-12-374407-4.
- 150. Rahman, M. U., Wang, W., Sun, Q., Shah, J. A., Li, C., Sun, Y., ... & Wang, S. (**2021**). Endolysin, a promising solution against antimicrobial resistance. *Antibiotics*, 10(11), 1277.
- 151. Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S., & Ravel, J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(2), 303-329.
- 152. Rastogi, V. K., Wallace, L., Smith, L. S., Ryan, S. P., & Martin, B. (**2009**). Quantitative method to determine sporicidal decontamination of building surfaces by gaseous fumigants, and issues related to laboratory-scale studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3688-3694.
- Read, T. D., Salzberg, S. L., Pop, M., Shumway, M., Umayam, L., Jiang, L., ... & Fraser, C. M. (2002). Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis. Science*, 296(5575), 2028-2033.
- 154. Reddy, B. L., & Saier Jr, M. H. (**2013**). Topological and phylogenetic analyses of bacterial holin families and superfamilies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(11), 2654-2671.
- 155. Rohwer, F., & Edwards, R. (2002). The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *Journal of Bacteriology*, 184(16), 4529-4535.
- 156. São-José, C., Parreira, R., Vieira, G., & Santos, M. A. (2000). The N-terminal region of the Oenococcus oeni bacteriophage fOg44 lysin behaves as a bona fide signal peptide in Escherichia coli and as a cis-inhibitory element, preventing lytic activity on oenococcal cells. Journal of Bacteriology, 182(20), 5823-5831.
- 157. São-José, C., Santos, S., Nascimento, J., Brito-Madurro, A. G., Parreira, R., & Santos, M. A. (2004). Diversity in the lysis-integration region of oenophage genomes and evidence for multiple tRNA loci, as targets for prophage integration in *Oenococcus oeni*. *Virology*, 325(1), 82-95.
- 158. Sass, P., & Bierbaum, G. (2007). Lytic activity of recombinant bacteriophage φ11 and φ12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 347-352.
- 159. Schleifer, K. H., & Kandler, O. (**1972**). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, 36(4), 407-477.

- 160. Schmelcher, M., Donovan, D. M., & Loessner, M. J. (**2012**). Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiology*, 7(10), 1147-1171.
- Schmidt, C., Velleman, M., & Arber, W. (1996). Three functions of bacteriophage P1 involved in cell lysis. *Journal of Bacteriology*, 178(4), 1099-1104.
- 162. Schuch, R., & Fischetti, V. A. (2006). Detailed genomic analysis of the Wβ and γ phages infecting *Bacillus anthracis*: implications for evolution of environmental fitness and antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 188(8), 3037-3051.
- 163. Schuch, R., & Fischetti, V. A. (2009). The secret life of the anthrax agent *Bacillus anthracis*: bacteriophage-mediated ecological adaptations. *PloS One*, 4(8), e6532.
- 164. Schuch, R., Nelson, D., & Fischetti, V. A. (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis. Nature*, 418(6900), 884-889.
- 165. Schuch, R., Pelzek, A. J., Nelson, D. C., & Fischetti, V. A. (**2019**). The PlyB endolysin of bacteriophage vB_BanS_Bcp1 exhibits broad-spectrum bactericidal activity against *Bacillus cereus* sensu lato isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(9), e00003-19.
- 166. Schulz, E. C., Dickmanns, A., Urlaub, H., Schmitt, A., Mühlenhoff, M., Stummeyer, K., ... & Ficner, R. (2010). Crystal structure of an intramolecular chaperone mediating triple–β-helix folding. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(2), 210-215.
- 167. Sharma, S., Datta, S., Chatterjee, S., Vairale, M. G., & Dwivedi, S. K. (**2021**). Potential application of bacteriophage in decontaminating biothreat agents. *Defence Life Science Journal*, 6(1), 69-83
- Shen, Y., Kalograiaki, I., Prunotto, A., Dunne, M., Boulos, S., Taylor, N. M., ... & Loessner, M. J. (2021). Structural basis for recognition of bacterial cell wall teichoic acid by pseudo-symmetric SH3b-like repeats of a viral peptidoglycan hydrolase. *Chemical Science*, 12(2), 576-589.
- 169. Simonsen, K. A., & Chatterjee, K. (2020). Anthrax. InStatPearls. StatPearlsPublishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507773).
- 170. Sozhamannan, S., McKinstry, M., Lentz, S. M., Jalasvuori, M., McAfee, F., Smith, A., ... & Read, T. D. (2008). Molecular characterization of a variant of *Bacillus anthracis*-specific phage AP50 with improved bacteriolytic activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6792-6796.
- 171. Speck, P., & Smithyman, A. (**2016**). Safety and efficacy of phage therapy via the intravenous route. *FEMS Microbiology Letters*, 363(3).
- 172. Stokar-Avihail, A., Tal, N., Erez, Z., Lopatina, A., & Sorek, R. (2019). Widespread utilization of peptide communication in phages infecting soil and pathogenic bacteria. *Cell Host & Microbe*, 25(5), 746-755.
- 173. Sue, D., Hoffmaster, A. R., Popovic, T., & Wilkins, P. P. (**2006**). Capsule production in *Bacillus cereus* strains associated with severe pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3426-3428.
- 174. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris Jr, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649-659.

- 175. Tato, I., Zunzunegui, S., De La Cruz, F., & Cabezon, E. (2005). TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proceedings* of the National Academy of Sciences, 102(23), 8156-8161.
- 176. Totté, J. E., van Doorn, M. B., & Pasmans, S. G. (2017). Successful treatment of chronic *Staphylococcus aureus*-related dermatoses with the topical endolysin Staphefekt SA. 100: a report of 3 cases. *Case Reports in Dermatology*, 9(2), 19-25.
- 177. Tourasse, N. J., & Kolstø, A. B. (2008). Survey of group I and group II introns in 29 sequenced genomes of the *Bacillus cereus* group: insights into their spread and evolution. *Nucleic Acids Research*, 36(14), 4529-4548.
- 178. Turnbull, P.C.B. (**1998**). Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals, 3rd ed.; World Health Organization (WHO): Geneva, Switzerland, 1–97.
- 179. Turner, D., Kropinski, A. M., & Adriaenssens, E. M. (2021). A roadmap for genome-based phage taxonomy. *Viruses*, 13(3), 506.
- 180. Turner, D., Reynolds, D., Seto, D., & Mahadevan, P. (2013). CoreGenes3. 5: a webserver for the determination of core genes from sets of viral and small bacterial genomes. *BMC Research Notes*, 6(1), 1-4.
- 181. Turner, D., Shkoporov, A. N., Lood, C., Millard, A. D., Dutilh, B. E., Alfenas-Zerbini, P., ... & Adriaenssens, E. M. (2023). Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Archives of Virology*, 168(2), 74.
- 182. USEPA R.E.D. Facts Sodium and calcium hypochlorite salts (738-F-91-108, Sep. 1991) [Internet] Washington, D.C.: United States Environmental Protection Agency; [Accessed 2020 Feb 10]. https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_G-77_1-Sep-91.pdf.
- 183. Valente, L., Prazak, J., Que, Y. A., & Cameron, D. R. (**2021**). Progress and pitfalls of bacteriophage therapy in critical care: a concise definitive review. *Critical Care Explorations*, 3(3).
- 184. Veesler, D., Robin, G., Lichière, J., Auzat, I., Tavares, P., Bron, P., ... & Cambillau, C. (2010). Crystal structure of bacteriophage SPP1 distal tail protein (gp19. 1): a baseplate hub paradigm in gram-positive infecting phages. *Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36666-36673.
- 185. Vegge, C. S., Brøndsted, L., Neve, H., Mc Grath, S., van Sinderen, D., & Vogensen, F. K. (2005). Structural characterization and assembly of the distal tail structure of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *Journal of Bacteriology*, 187(12), 4187-4197.
- 186. Voelker, R. (2019). FDA approves bacteriophage trial. Jama, 321(7), 638-638.
- 187. Walmagh, M., Boczkowska, B., Grymonprez, B., Briers, Y., Drulis-Kawa, Z., & Lavigne, R. (2013). Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(10), 4369-4375.
- 188. Weant, K. A., Bailey, A. M., Fleishaker, E. L., & Justice, S. B. (**2014**). Being prepared: bioterrorism and mass prophylaxis: part I. *Advanced Emergency Nursing Journal*, 36(3), 226-238.
- White, H. E., & Orlova, E. V. (2019). Bacteriophages: their structural organisation and function. Rijeka: InTech.

- 190. Wood, J. P., & Martin, G. B. (2009). Development and field testing of a mobile chlorine dioxide generation system for the decontamination of buildings contaminated with *Bacillus anthracis*. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3), 1460-1467.
- 191. Wood, J. P., Archer, J., Calfee, M. W., Serre, S., Mickelsen, L., Mikelonis, A., ... & Rastogi, V. K. (2021). Inactivation of *Bacillus anthracis* and *Bacillus atrophaeus* spores on different surfaces with ultraviolet light produced with a low-pressure mercury vapor lamp or light emitting diodes. *Journal* of Applied Microbiology, 131(5), 2257-2269.
- 192. Wright, A., Hawkins, C. H., Änggård, E. E., & Harper, D. R. (2009). A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clinical Otolaryngology*, 34(4), 349-357.
- 193. Xu, Q., Abdubek, P., Astakhova, T., Axelrod, H. L., Bakolitsa, C., Cai, X., ... & Wilson, I. A. (2010). Structure of the γ-D-glutamyl-L-diamino acid endopeptidase YkfC from *Bacillus cereus* in complex with L-Ala-γ-D-Glu: insights into substrate recognition by NlpC/P60 cysteine peptidases. Acta Crystallographica Section F: *Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(10), 1354-1364.
- 194. Yoong, P., Schuch, R., Nelson, D., & Fischetti, V. A. (**2006**). PlyPH, a bacteriolytic enzyme with a broad pH range of activity and lytic action against *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*, 188(7), 2711-2714.
- 195. Young, R. (2005) Phage lysis. In Phages. Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology; Waldor, K.M., Friedman, D.I., Adhya, S.A., Eds.; ASM Press: Washington, DC, USA, 92–127.
- 196. Young, R. Y. (**1992**). Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiological Reviews*, 56(3), 430-481.
- 197. Yuan, Y., Peng, Q., & Gao, M. (**2012**). Characteristics of a broad lytic spectrum endolysin from phage BtCS33 of *Bacillus thuringiensis*. *BMC Microbiology*, 12(1), 1-9.
- 198. Żakowska, D., Wlizło-Skowronek, B., Wójcicka, P., Stawecka-Hamerla, M., & Naylor, K. (2022). Vaccines Against Anthrax–Selected Research. *Postępy Mikrobiologii-Advancements of Microbiology*, 61(1), 7-12.
- 199. Zhang, L., Xu, D., Huang, Y., Zhu, X., Rui, M., Wan, T., ... & Gong, Y. (**2017**). Structural and functional characterization of deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2 HNH endonuclease. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13.
- 200. Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K. H., Dennis, J. J., & Wishart, D. S. (2011). PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_2), W347-W352.
- 201. Zimmermann, L., Stephens, A., Nam, S. Z., Rau, D., Kübler, J., Lozajic, M., ... & Alva, V. (2018). A completely reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its core. *Journal of Molecular Biology*, 430(15), 2237-2243.

11. ZAŁĄCZNIKI

Zał. 1. Wyniki analizy HHpred dla wybranych białek faga J5a – w większości hipotetycznych/konserwatywnych białek o nieznanej funkcji. Większość z tych białek ma homologi w fagach F16Ba i z1a. Gdzie to możliwe, podano kilka najlepszych wyników, z regionami dopasowania, identyfikatorem PDB i prawdopodobieństwem HHpred (%) dopasowania tych regionów. Przedstawiono jedynie ORF-y z wynikami prawdopodobieństwa homologów powyżej 80%. ORF-y unikatowe dla faga J5a (bez odpowiedników białkowych w fagach F16Ba i z1a) zaznaczono gwiazdką. Zgodnie z BLASTp, odpowiadające białka oceniono jako te, które wykazują więcej niż 70% identyczności sekwencji.

ORF	Długość białka (aa)	Region dopasowa nia (aa)	Najlepsze dopasowania HHpred	PDB ID	Prawdopo- dobieństwo (%)
J5a_019	108	73-106	<i>Homo sapiens</i> Transcription initiation factor IIE, alpha subunit; zinc finger	1VD4_A	98,45
	-	74-106	<i>Thermococcus kodakarensis</i> DNA-directed RNA polymerase subunit P	4QIW_P	98,36
	-	75-106	<i>Sulfolobus shibatae</i> DNA-directed RNA polymerase; transferase, multi-subunit	4AYB_P	98,23
J5a_024	210	2-81	Mycobacterium tuberculosis (strain ATCC 25618/H37Rv) transcriptional regulator; DNA binding protein	5ZHC_B	97,41
		10-77	Bacteroides thetaiotaomicron uncharacterized protein	2L02_A	97,36
	-	13-80	Enterobacteria phage T4 transcription regulatory protein MOTA	1BJA_B	97,33
	-	128-184	Severe fever with thrombocytopenia virus RNA polymerase	6NTV_A	90,09
	-	128-184	Toscana virus RNA-dependent RNA polymerase	6QW0_B	89,29
J5a_027	287	35-116	<i>Bacillus subtilis</i> DNA replication protein DnaD; primosome, DNA-binding protein	2V79_A	98,49
	-	35-96	Sulfolobus tokodaii 109aa long hypothetical transcriptional regulator; helix-turn-helix	2D1H_B	98,22
	-	35-96	<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426 chromosome replication initiation protein; DnaD	2VN2_C	98,21
J5a_029	428	12-384	Bacillus phage phi3T AimR transcriptional regulator	5ZVV_B	99,97
	-	9-386	<i>Bacillus</i> phage SPbeta AimR transcriptional regulator; DNA binding protein, peptide binding protein, complex with peptide	5Y24_B	99,97
	-	7-276	Bacillus thuringiensis transcriptional activator PlcR protein	3U3W_B	99,94
J5a_032	119	1-70	Streptococcus suis 05ZYH33 ComR; Streptococcus, Competence, Quorum sensing, ComR, TRANSCRIPTION REGULATOR	5FD4_B	99,40
	-	1-108	<i>Streptococcus vestibularis</i> F0396 transcriptional regulator ComR; RNPP family TPR domain HTH domain bacterial signaling peptide binding, TRANSCRIPTION	6HU8_A	99,28
		2-69	Staphylococcus aureus Orf20; SaPI, Repressor, STRUCTURAL PROTEIN	6H49_A	99,20
	-	1-119	<i>Clostridium difficile</i> 630 putative transposon-related DNA- binding protein	3IVP_B	99,18
J5a_033	75	4-71	Cytophaga hutchinsonii uncharacterized protein	3OMT_B	99,10
	-	4-72	Streptococcus suis 05ZYH33 ComR; Streptococcus, Competence, Quorum sensing, ComR, TRANSCRIPTION REGULATOR	5FD4_B	99,07
	-	1-69	Bacillus thuringiensis transcriptional activator PlcR protein	3U3W_B	99,06
J5a_040	77	1-63	Methanococcus maripaludis S2 conserved uncharacterized archaeal protein	2QZG_C	91,42
	-	2-63	Thermoplasma acidophilum UPF0147 protein Ta0600	2QSB_A	85,94
	-	12-47	Drosophila melanogaster maternal effect protein oskar; 3'- UTR, dimerization, RNA BINDING PROTEIN	5CD8_B	82,23
		1-41	Bacillus subtilis PROTEIN (SINI PROTEIN); TRANSCRIPTION REGULATOR	1B0N_B	80,87

J5a_044*	59	4-55	<i>Kluyveromyces lactis</i> (strain ATCC 8585/CBS 2359/DSM 70799/NBRC 1267/NRRL Y-1140/WM37) mRNA decay, decapping, Nudix, nucleotide analog, TRANSLATION	6AM0_D	93,80
		5-58	Staphylococcus aureus host factor for Q beta; Hfq, hexamer, RNA binding protein, translational regulator, Sm motif, TRANSLATION	1KQ1_H	91,35
		5-45	Listeria monocytogenes protein hfq; LSm/Sm proteins, RNA chaperone, RNA BINDING PROTEIN	4NL2_C	90,52
J5a_047*	77	10-71	<i>Pyrococcus furiosus</i> DNA double-strand break repair rad50 ATPase; zinc finger, rad50, DNA repair, Recombination	1L8D_A	95,80
		12-62	Saccharomyces cerevisiae Protein PCF11; zinc-binding, mRNA, RNA processing, RNA binding protein	5M9Z_A	95,59
		10-70	<i>Pyrococcus furiosus</i> (strain ATCC 43587/DSM 3638/JCM 8422/Vc1) DNA double-strand break repair Rad50 ATPase; double strand break repair, DNA damage response	6ZFF_B	94,40
J5a_051*	83	12-39	<i>Homo sapiens</i> Myc-binding protein; conserved hypothetical protein	2YY0_D	92,37
		3-44	Escherichia coli cell division protein ZAPB	2JEE_C	91,88
		3-44	Bacillus subtilis 168 initiation-control protein YabA; YabA, DnaA, DnaN, Zinc finger, initiation control, replication	5DOL_B	91,42
		12-58	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (strain ATCC 204508/S288c) mediator of RNA polymerase II transcription subunit 4; transcription initiation	50QM_h	90,44
J5a_053	62	1-30	Haloarcula marismortui 50S ribosomal protein LX; 50S ribosomal subunit, ribonucleoprotein, RNA binding, tRNA binding, metal binding	4V9F_6	88,95
		1-30	Escherichia coli bacterial RNA polymerase inhibitor	4LLG_N	88,74
		1-30	<i>Enterobacteria</i> phage T7 bacterial RNA polymerase inhibitor	2LMC_A	87,03
J5a_056	74	2-27	De Novo protein coiled-coil Trimer with Glu:Val:Lys Triad	6Q1W_B	88,30
		3-35	Bovine Adenovirus 3 assembly intermediate	3ZIF_O	87,40
J5a_059	63	35-55	<i>Clostridium botulinum</i> Bot.2110.4; mini-protein binder, inhibitor, TOXIN	5VMR_C	93,20
		30-54	<i>Homo sapiens</i> coiled-coil domain-containing protein 90B, mitochondrial, general control protein GCN4	6H9M_C	91,48
		12-61	Silicibacter sp. uncharacterized peroxidase-related protein; YP_614459.1	2PFX_A	89,37
J5a_060	84	2-66	Homo sapiens general transcription factor IIE subunit 1	5GPY_A	98,90
		2-70	Pyrococcus furiosus transcription factor E	6PLN_A	98,76
		2-71	Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508/S288c) transcription initiation factor IIE subunit alpha	6GYM_W	98,73
J5a_061	48	1-42	Thermococcus kodakarensis DNA-directed RNA polymerase subunit P	4QIW_W	97,60
		2-35	<i>Pyrococcus furiosus</i> rubrerythrin; Non heme iron peroxidases, oxidative stress	3PWF_B	96,41
		1-46	<i>Pyrococcus furiosus</i> hypothetical protein Pf0610; winged- helix like protein with metal binding site	2GMG_A	95,34
J5a_062	137	2-45	Thermococcus kodakarensis DNA-directed RNA polymerase subunit P	4QIW_W	96,60
		4-45	Sulfolobus shibatae DNA-directed RNA polymerase	4AYB_P	95,63
J5a_063	127	1-78	HNH endonuclease; Thermophilic bacteriophage, HNH Endonuclease, DNA nicking, HYDROLASE; 1.52A { <i>Geobacillus</i> virus E2}	5HOM_A	99,83

Zał. 2. Wyniki analizy HHpred dla hipotetycznych/konserwatywnych białek fagów F16Ba i z1a o nieznanej funkcji, niemające odpowiedników wśród białek faga J5a. Gdzie to możliwe, podano kilka najlepszych wyników, z regionami dopasowania, identyfikatorem PDB i prawdopodobieństwem HHpred (%) dopasowania tych regionów. Przedstawiono jedynie ORF-y z wynikami prawdopodobieństwa homologów powyżej 80%. Odpowiadające białka podano w nawiasie. ORF-y unikatowe dla danego faga zaznaczono gwiazdką. Zgodnie z BLASTp, odpowiadające białka oceniono jako te, które wykazują więcej niż 70% identyczności sekwencji.

ORF	Długość białka (aa)	Region dopasowa nia (aa)	Najlepsze dopasowania HHpred	PDB ID	Prawdopo- dobieństwo (%)
F16Ba_020 (z1a_020)	197	74-194	<i>Escherichia coli</i> conjugal transfer protein trwb; coupling protein, bacterial conjugation, f1-atpase-like quaternary structure, ring helicases	1E9R_A	99,52
	_	75-196	<i>Legionella pneumophila</i> IcmO (DotL); Protein Complex, Secretion, Secretion systems, Gram-negative bacteria, type 4 secretion system, T4SS, coupling protein	6SZ9_A	99,39
	_	88-197	Thermoanaerobacter pseudethanolicus type IV secretory pathway virb4 components-like protein; hydrolase	4AG6_B	99,04
		57-196	<i>Sulfolobus solfataricus</i> hera; hydrolase, nura, helicase, translocase	4D2I_B	98,96
F16Ba_030*	444	35-413	<i>Bacillus</i> phage SPbeta AimR transcriptional regulator; DNA binding protein, peptide binding protein	5Y24_A	100
		37-410	Bacillus phage phi3T AimR transcriptional regulator	5ZVV_A	100
	_	33-299	Bacillus thuringiensis transcriptional activator PlcR protein	3U3W_A	99,92
z1a_046*	132	1-115	<i>Streptococcus pneumoniae</i> lipoprotein; lipocalin, PccL, virulence, transport protein	5CYB_A	97,02
	_	1-88	<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2 51 superoxide dismutase [Cu- Zn]; Respiratory, Supercomplex, SOD, Mycobacterium, ETC, Lipoprotein, ELECTRON TRANSPORT	6ADQ_Z	96,53
		1-118	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> chaperone CupB2; Ig fold, periplasmic chaperone	3Q48_A	93,31

Carmel_S (KY963371.	A Tavor_SA 1) (KY963369.1)	Negev_SA (KY963370.1)	AP631 (MK085976.1)	Fah (DQ150593.1)	Wbeta (DQ289555.1)	Cherry (DQ222851.1)	Gamma izolat 53 (DQ222855.1)	Gamma izolat 51 (DQ222853.1)	Gamma izolat D'Herelle (DQ289556.1)
23000-231	19 23449-23568	22999-23115	26041-26163	7770- 7946	22202-22321	24711- 24866	24710- 24865	24852-25079	22174-22293
26898-270	38 28849-29004	26860-27009		22037- 22156	27510-27665	35273- 35527	36734- 36988	25349-25504	25478- 25633
	27347-27487			34644- 34766	37546-37668	35726- 35917	37187- 37378	35911-36165	34052- 34174
				25899-26048	26064-26213			36364-36555	

Zał. 4. Wartości identyczności wszystkich białek faga J5a względem białek pozostałych analizowanych fagów. Gwiazdki oznaczają ORF-y, których długość została zmieniona zgodnie z ich szczegółową analizą translacji. Zielony kolor oznacza nowo dodane ORF-y.

Numer ORF J5a	Liczba aa	Znana lub przewidywana funkcja	zla	F16Ba	Carmel_SA	Tavor_SA	Negev_SA	AP631	Fah	Wbeta	Cherry	Gamma izolat 53	Gamma izolat 51	Gamma izolat D'Herelle
1.	161	Terminase small subunit	154/161	158/161	153/161	159/161	159/161	158/161	158/161	158/161	158/161	158/161	158/161	158/161
2.	565	Terminase large subunit	556/565	555/565	556/565	562/565	562/565	561/565	560/565	559/565	558/565	559/565	558/565	558/565
3.	432	Portal protein	424/432	425/432	425*/432	423*/432	422*/432	424/432	424*/432	424/432	424/432	424/432	424/432	424/432
4.	206	Prohead protease	202/206	203/206	203*/206	202/206	202/206	203/206	203/206	203/206	203/206	203/206	203/206	203/206
5.	392	Major capsid protein	385/392	378/392	379/392	385/392	379/392	385/392	379/392	379/392	379/392	379/392	379/392	379/392
6.	96	Head-tail connector protein	95/96	94/96	92/96	95/96	92/96	95/96	92/96	92/96	95/96	92/96	92/96	95/96
7.	107	Head-tail adaptor protein	101/107	104/107	100/107	96/107	105/107	104/107	105/107	105/107	105/107	105/107	105/107	105/107
8.	146	Hypothetical protein	146/146	146/146	145/146	111/145	146/146	115/145	145/146	145/146	145/146	145/146	145/146	145/146
9.	119	DUF3168 domain protein	114/119	117/119	114/119	104/119	117*/119	115/119	118/119	118/119	118/119	118/119	118/119	118/119
10.	202	Major tail protein	197/202	194/202	177/202	195/202	195/202	176/202	195/202	195/202	195/202	195/202	195/202	195/202
11.	105	Hypothetical protein	104/105	75/105	105/105	77/105	75/105	75/105	75/105	75/105	75/105	75/105	75/105	75/105
12.	64	Hypothetical protein	63/64	53/58	57/58	46/58	ı	33/37	53/58	53/58	53/58	53/58	53/58	53/58

1203/1283	444/496	1057/1331	ı	ı	unrelated (141 aa)		unrelated (233 aa)		unrelated (165 aa)			22/70	93/102	55/60	409/429	205/210	78/78	
1203/1283	444/496*	1025/1288	ı	-	unrelated (141 aa)		unrelated (233 aa)	ı	unrelated (165 aa)			22/70	93/102	55/60	409/429*	205/210*	78/78	
1203/1283	443/496*	1025/1288	I	I	umrelated (141 aa)	ı	unrelated (233 aa)	I	umrelated (165 aa)			22/70	93/102	55/60	409/429*	204/210*	78/78	
1203/1283	444/496*	1023/1288	I	I	unrelated (141 aa)	ı	unrelated (233 aa)	I	unrelated (163 aa)			22/70	93/102	55/60	409/429*	205/210*	78/78	
1203/1283	443/496	1057/1331	I		unrelated (141 aa)	ı	unrelated (233 aa)	I	unrelated (165 aa)			22/70	93/102	55/60	409/429	205/210	78/78	
1203/1283	444/496*	1024/1288	I	-	umrelated (141 aa)	I	umrelated (233 aa)	I	unrelated (165 aa)			22/70	93/102	55/60	409/429	205/210*	78/78	
1219/1283	445/496	1095/1309	I		umrelated (141 aa)	ı	unrelated (233 aa)	I	unrelated (163 aa)			22/70	93/102	55/60	376/397 + 38/65	204/210*	I	unrelated (72)
1250/1283	448/496	1036/1332	71/78	74/79		333/351		100/109		umrelated (194 aa)		51/65	86/102*	54/60	405/429 *	203/210*	I	unrelated (72)
800/845 + 394/438	450/496	1076/1332	71/78	73/79		334/351		86/109*		umrelated (163 aa)	(60 aa)	22/67*	86/102	55/60	407/429	205/210*	I	unrelated (72)
1219/1283	441/496	1075/1321	71/78	73/79		332/351		102/109*		unrelated (197 aa)		57/65*	87/102	55/60	407/429	204/210*	75/78	
1251/1283	447/496	1083/1355	72/78	78/79		331/351		99/109		unrelated (197 aa)		57/65	91/102	55/60	424/429	209/210	78/78	
1192/1283	444/496	1155/1308	72/78	73/79		334/351		103/109		unrelated (194 aa)		58/65	88/102	54/60	405/429	206/210	75/78	
Tail length tape-measure protein	Distal tail protein	Tal/RBP (Tail lysozyme/receptor-binding protein)	XpaF1 protein (hemolysin of Xhla1 protein family)	Holin	Holin	N-acetylmuramoyl-L- alanine amidase	N-acetylmuramoyl-L- alanine amidase	Hypothetical protein	Predicted lipoprotein		Hypothetical protein, partly similar to J5a ORF033	Repressor protein	Hypothetical protein	Hypothetical protein	Ftsk/SpoIIIE family protein (cell division protein FtsK)	Conserved phage protein	HTH cro/C1-type domain- containing protein (putative transcription regulator)	Putative transcriptional regulator of Xre family, putative phage repressor
1283	496	1309	78	6 <i>L</i>		351		108				64	100	60	429	210	78	
13.	14.	15.	16.	17.		18.		19.				20.	21.	22.	23.	24.	25.	

		-		r	r			r	r	r					1		r	r	
<mark>39/39</mark>	280/287	261/481				28/36	61/75	16/52*	48/51	145/271		188/217	294/315	297/303	72/77	219/248	151/158	164/180	ı
39/39	280/287	261/481	,	ı		28/36	<u>61/75</u>	16/52	48/51	145/271		188/217	294/315*	297/303	72/77	219/248	151/158	164/180	I
39/39	280/287	261/481	1	ı		1		16/52	48/51	145/271		188/217	286/315*	297/303	72/77	218/248	151/158	164/180	I
39/39	280/287	261/481	,	ı		1	ı	16/52	48/51	145/271		188/217	294/315*	297/303	72/77	218/248	151/158	164/180	I
<mark>39/39</mark>	280/287	261/481	215/414	14/46		90/118	61/75	16/52*	48/51	145/271		188/217	294/315	297/303	72/77	219/248	151/158	164/180	I
<mark>39/39</mark>	280/287	261/481	215/414	14/46		90/118	61/75	16/52	48/51	145/271		188/217	276/306*	297/303	72/77	219/248	ı		I
26/39	263/287	259/481	218/414	17/46		91/117*	61/75	15/52	48/51	146/275		166/175 50/55	288/305	292/303	72/77	220/248	139/157	170/180	I
<mark>25/39</mark>	269/287	263/481	217/414	14/46		90/117*	61/75	16/52	42/51	23/227		127/216*	291/311*	298/303*	71/77*	242/248	151/158	170/180	I
<mark>26/39</mark>	275/287	467/484*	422/428	45/46	48/51	118/119	75/75	53/55*	48/51	147/275		188/217*	277/323*	299/303*	72/77	241/248	152/158	174/180*	I
<mark>29/39</mark>	263/287	260/480	339/428	32/46		91*/117	61/75	16/52	43/53	243/248	unrelated (125)	119/216	286/316*	288/303*	72/77	235/248	151/158	172/180	I
39/39	281/287	262/481	215/414	14/46		6/117	61/75	16/52	48/51	242/248	unrelated (125)	121/216	277/313	298/303	72/77	241/248	152/158	175/180	I
29/39	269/287	469/484	425/428	44/46	46/51	118/119	72/75	54/55*	47/51	245/248	unrelated (125)	117/216	283/322	291/303	72/77	219/248	148/158	175/180	I
Hypothetical protein	Conserved phage protein (HTH cro/Cl-type domain- containing protein)	Site-specific recombinase	Transcriptional regulator (AimR family lysis- lysogeny pheromone receptor)	AimP	Hypothetical protein	Hypothetical protein (HTH Cro/C1 family protein), transcriptional regulator of Xr	Hypothetical protein (HTH Cro/C1 family protein)	Hypothetical protein	Hypothetical protein	Putative antirepressor	Hypothetical protein	Hypothetical protein	Replication initiation protein	Putative DNA replication protein DnaC	Hypothetical protein	Sigma-70 family RNA polymerase sigma factor	Hypothetical protein	Dimeric dUTPase	Hypothetical protein, putative RNA-binding
39	287	484	428	46	51	119	75	55	51	248		217	306	303	77	248	158	180	59
26.	27.	28.	29.	30.	31.	32.	33.	34.	35.	36.		37.	38.	39.	40.	41.	42.	43.	44.

	ı	ı		ı	I	ı	ı	r
	1	I	72	ı	1	ı		1
	1	I	ı	479	1	ı	-	ı
	1	I	76	ı	ı	ı	-	ı
	1	I	ı	471	ı	ı	-	ı
	1	I	ı	ı	1	ı		1
	1	I	ı	351	1	88		1
	1	I	ı	I	1	ı	ı	1
	1	91	ı	I	1	ı	ı	1
	1	I	ı	ı	261	ı		ı
	1	I	ı		261	ı	-	ı
	132	I	ı	ı	ı	ı	-	ı
protein, structurally similar to Hfq (HHpred 1846677); no phage homologs	Hypothetical protein, unique for z1a (z1a_045) in <i>Wbetavirus</i> genus, but encoded by other <i>Bacillus</i> phages (HHpred 6692620), putative lipopotein, contains signal peptide)	Hypothetical protein, only one similar phage protein with ~40% identity,	Hypothetical protein, only in Cherry and Gamma, but also in 10 other <i>Bacillus</i> phages (HHpred 8770880)	Collagen triple helix repeat- containing protein, similarities to lambdoid phages tail fiber proteins	Sulfotransferase and mannose-binding protein (HHpred 3635837) unique for F16Ba and Carmel_SA, no homolog in other phages	Hypothetical protein, unique for AP631 among viruses, possible anti-toxin (HHpred 5513470)	Hypothetical protein, unique for J5a among viruses, (HHpred 7760117)	Conserved phage protein, common in other phages but only in J5 a among <i>Wbetavirus</i> phages, present in many strains of <i>B</i> . <i>thuringiensis</i> and other bacteria, putative glucose epimerase (HHpred
							56	200
							45.	46.
	ı	ı	ı	ı	ı	ı	56/79	
----------	--	---	---	---	--	--	--	
	1	ı	ı	1	ı	1	56/79	
	1	1	ı	1	1	ı	56/79	
		ı	ı	ı	ı	I	56/79	
	1	1		1	1		56/79	
	1	1	ı	1	1		56/79	
	1	ı	1	1	r	I	54/62	
	ı	I	I	1	I	ı	56/79	
	75/77	I	ı	1	I	ı	56/62	
	1	1	ı	1	1	ı	54/62	
	ı	I	I	1	I	ı	57/62	
	1	1	ı	1	1	ı	55/62	
7740054)	Hypothetical protein, only in J5a and Tavor. SA among <i>Wbetaviruses</i> ; identical or nearly identical proteins are encoded by several <i>Bacillus</i> strains	Hypothetical protein, only in J5a among <i>Wbetavirus</i> phages, present in 12 other phages; identical or nearly identical protein is encoded by many strains of various <i>Bacillus</i> species	Hypothetical protein, only in J5a among phages	Hypothetical protein, only in J5a among <i>Wbetavirus</i> phages, nearly identical in N-terminal moiety to the N- terminal moiety of an uncultured phage protein 9 AX2_46; identical or nearly identical protein in their N-terminal moieties are encoded by many strains of various <i>Bacillus</i> species	Hypothetical protein; only in J5a among <i>Wbetavirus</i> phages, nearly identical in N-terminal moiety to the C- terminal moiety of an uncultured phage protein 9AX2_46	Hypothetical protein; only in J5a among <i>Wbetavirus</i> phages, nearly identical to a <i>B. thuringiensis</i> protein	Hypothetical protein; putative inhibitor of RNA polymerase (HHpred	
	77	53	38	146	83	96	62	
	47.	48.	49.	50.	51.	52.	53.	

		5227104; E=0.025, Probability 96.15)												
54.	40	Hypothetical protein	39/40	38/40	38/40	40/40	40/40	36/40	<u> 39/40</u>	<u>39/40</u>	39/40	39/40	39/40	3 <u>9/40</u>
55.	131	RNA polymerase sigma factor, sigma-70 family	127/131	128/131	127/131	127/131	129/131	129/13	129/131*	129/131*	129/131	129/131	129/131	129/131*
56.	74	Hypothetical protein	<i>57/7</i> 4	56/74	57/74	63/74	64/74	34/88 ^a	64/74	64/74	64/74	64/74	64/74	64/74
57.	73	Hypothetical protein	65/73	65/73	67/73	65/73	65/73	72/73 ^a	65/73*	65/73	65/73	65/73	65/73	65/73
58.	109	Hypothetical protein	102/109	-	101/109	-	-	ı	ı	-			-	ı
59.	63	Hypothetical protein	63/63	ı	62/63	63/63	63/63	ı	62/63	62/63	62/63	62/63	62/63	62/63
60.	84	Hypothetical protein, putative transcription initiation factor (HHpred 7442310)	81/84	73/82	79/84	82/84	81/84	75/84*	80/84*	80/84	80/84	80/84	<mark>80/84</mark>	80/84
61.	48	Hypothetical protein; putative DNA-directed RNA polymerase subunit	41/56*	ı	41/56*	44/58*	43/73*	40/56*	48/56*	48/56*	48/56*	48/56*	48/56*	48/56*
62.	137	Hypothetical protein	132/137	-	98/137	36/88	43/88	99/137	43/88	44/95	43/88	43/88	43/88	44/95
		Hypothetical protein					unrelated (63)		unrelated (63)	unrelated (63)	unrelated (63)	unrelated (63)	unrelated (63)	unrelated (63)
63.	127	HNH endonuclease	122/127	124/127	125/127	125/127	123/127	125/127	125/127	125/127	125/127	125/127	125/127	125/127

Zał. 5. Wpływ zmodyfikowanych lizyn LysJ i LysF na gęstość optyczną zawiesin komórek wybranych szczepów z rodzaju *Bacillus* – wykresy przedstawiające słabe działanie lizyn lub brak działania. Lizyny dodawano indywidualnie do hodowli bakterii zawieszonych w 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, do uzyskania stężenia końcowego 50 μg/ml. Zawiesina bakterii z dodatkiem 1x stężonego PBS zamiast białka służyła jako kontrola negatywna (0 μg/ml). Na każdym wykresie przedstawiono wyniki działania uzyskane dla obydwu lizyn.







Zał. 6. Dopasowanie sekwencji aminokwasowych białek Tal/RBP (J5a_015 i jego odpowiedników) fagów J5a, F16Ba, z1a i innych fagów podobnych do Wbeta.

000371991	1	MRTPSGILHVVDFKTDOIVAAIOPEDYWDDKRHWELKNNVDMIDFTAFDGTDHAVALOOONLVLKEVRDGRIVPYVITET	80
00037255 1	1	MRTPSGTLHVVDEKTDOTVAATOPEDVWDDKRHWELKNNVDMLDETAEDGTDHAVTLOONIVU KEVRDGRTVPVTTET	80
ADW5851/ 1	1	MCTEGCTI UW/DEVENOTVAATOEDTWDDKDUWEI KNNVENI DETA DOCTDUAVET OONI VI KEVDOCTVDVVTEET	80
ARW50514.1	1	MS TF SGTLWVDFK TDQLVAALQFEDIWDDKRWELLWWVDMIDFIAFDGTDMAVILQQQNLVLKEVKDGRIVFIVIIEI	00
ARW58596.1	1	MRTPSGILHVVDFKIDGIVAAIQPEDIWDDARHWELANNVDMLDFIAFDGIDHAVILQQQNLVLAEVRDGRIVFIVIIEI	80
AZF88360.1	1	MRTPSGILHVVDFKTDQIVAAIQPEDYWDDKRHWELKNVVDMLDFTAFDGTDHAVTLQQQNLVLKEVRDGRIVPYVITET	80
<u>YP 459979.1</u>	1	MRTPSGILHVVDFKTDQIVAAIQPEDYWDDKRHWELKNVVDMLDFTAFDGTDHAVTLQQQNLVLKEVRDGRIVPYVITET	80
<u>QOQ37148.1</u>	1	MRTPSGILHVVDFKTDQIIAAIQPQDYWDDKRHWELKNNVDMLDFTAFDGTDDSATLQQQNLVLKEVRDGRIVPYVITET	80
ARW58457.1	1	MRTPSGILHVVDFKTDQIVAAIQPEDYWDDKRHWELKNNVDMLDFTAFDGTDHAVTLQQQNLVLKEVRDGRIVPYVITET	80
ABA46383.1	1	MRTPSGILHVVDFKTDQIVAAIQPEDYWDDKRHWELKNNIDMLDFTAFDGTDHAVTLQQQNLVLKEVRDGRIVPYVITET	80
YP_338198.1	1	MRTPSGILHVVDFKTDQIVAAIQPEDYWDDKRHWELKNNIDMLDFTAFDGTDHAVTLQQQNLVLKEVRDGRIVPYVITET	80
YP_512324.1	1	MRTPSGILHVVDFKTDQIVAAIQPEDYWDDKRHWELKNNIDMLDFTAFDGTDHAVTLQQQNLVLKEVRDGRIVPYVITET	80
<u>QOQ37199.1</u>	81	EKNSDNRSITTYASGAWVQIAKSGVIKPQRIESKTVNEFIDMALIGMKWERGQTDYAGFHTMTIDEFLDPLTFLKKIASL	160
QOQ37255.1	81	EKNSDTRSITTYASGAWIQIAKSGIIKPQRLESKTVNEFIDLALLGMKWQRGITEYAGFHTMTIDEYIDPLTFLKKIASL	160
ARW58514.1	81	EKNSDTRSITTYASGAWIQIAKSGIIKPQRLESKTVNEFIDLALLGMKWQRGITEYAGFHTMTIDEYIDPLTFLKKIASL	160
ARW58396.1	81	EKNSDKRFITTYASGAWIQIAKSGVIKPQRIESKTVNEFMDLALLGMKWQRGITEYAGFHTMTIDEYIDPLTFLKKIASL	160
AZF88360.1	81	EKNSDTRSITTYASGAWIQIAKSGIIKPQRIESKTVNEFIDLALLGMKWQRGVTEYAGFHTMTIDEYIDPLTFLKKIASL	160
YP 459979.1	81	EKNSDTRSITTYASGAWIQIAKSGIIKPQRIESKTVNEFMDLALLGMKWKRGITEYAGFHTMTIDEYIDPLTFLKKIASL	160
QOQ37148.1	81	EKNSDKRSITTYASGAWIQIAKSGIIKPQRIESKTVNEFIDLALLGMKWQRGITEYAGFHTMTIDEYIDPLTFLKKIASL	160
ARW58457.1	81	EKNSDKRSITTYASGAWIQIAKSGVIKPQRIESKTVNEFMDLALLGMKWQRGITEYAGFHTMTIDEYIDPLTFLKKIASL	160
ABA46383.1	81	EKNSDKRSITTYASGAWIQIAKSGVIKPQRIESKTVNEFMDLALLGMKWQRGVTEYAGFHTMTIDEYMDSLTFLKKIASL	160
YP 338198.1	81	EKNSDKRSITTYASGAWIQIAKSGVIKPQRIESKTVNEFMDLALLGMKWQRGVTEYAGFHTMTIDEYMDSLTFLKKIASL	160
YP_512324.1	81	EKNSDKRSITTYASGAWIQIAKSGVIKPQRIESKTVNEFMDLALLGMKWQRGVTEYAGFHTMTIDEYMDSLTFLKKIASL	160
Q0Q37199.1	161	FKLEIQYRVEVKGSQIIGWYVDMIQKRGRDTGKEIELGKDLIGVTRIEHTRDICTALVGFVKGEGDKVITIESINKGLPY	240
QOQ37255.1	161	FKLEIRYRVEIKGSRIIGWYVDMIQKRGHDTGKEIELGKDLVGVTRIEHTRNICSALVGFVKGEGDKVITIESINKGLPY	240
ARW58514.1	161	FKLEIRYRVEIKGSRIIGWYVDMIQKRGHDTGKEIELGKDLVGVTRIEHTRNICSALVGFVKGEGDKVITIESINKGLPY	240
ARW58396.1	161	FKLEIRYRVEIKGSRIIGWYVDMIQKRGHDTGKEIELGKDLVGVTRIEHTRNICTALVGFVKGEGDKVITIESINKGLPY	240
AZF88360.1	161	FKLEIRYRVEIKGSRIIGWYVDMIQKRGHDTGKEIELGKDLVGVTRIEHTRNICTALVGFVKGEGDKVITIESINKGLPY	240
YP_459979.1	161	FKLEIRYRVEIKGSRIIGWYVDMIQKRGHDTGKEIELGKDLVGVTRIEHTRNICSALVGFVKGEGDKVITIESINKGLPY	240
QOQ37148.1	161	FKLEIRYRVEVKGSKIIGWYVDMIQKRGYDTGKEIELGKDLVGVTRIEHTRNICTALVGFVKGEGDKIITIESINNGLPY	240
ARW58457.1	161	FKLEIRYRVEIKGSRIIGWYVDMIQKRGHDTGKEIELGKDLVGITRIEHTRNICTALVGFVKGEGDKVITIESINKGLPY	240
ABA46383.1	161	FKLEIRYRVEIKGSKIIGWYVDMIQKRGHDTGXEIELGKDXVGVTRIEHTRNICTALVGFVKGEGDKVITIESINKGLPY	240
YP_338198.1	161	FKLEIRYRVEIKGSKIIGWYVDMIQKRGHDTGKEIELGKDLVGVTRIEHTRNICTALVGFVKGEGDKVITIESINKGLPY	240
YP 512324.1	161	FKLEIRYRVEIKGSKIIGWYVDMIQKRGHDTGKEIELGKDLVGVTRIEHTRNICTALVGFVKGEGDKVITIESINKGLPY	240
QOQ37199.1	241	$\label{eq:constraint} IVDADAFQRWNEHGQHKFGFYTPETEELDMTPKRLLTLMEIELKKRVNSSISYEVEAQSIGRIFGLEHELINEGDTIKIK$	320
QOQ37255.1	241	IVDADAFQRWNEHGQHKFGFYTPETEELDMTPKRLLTLMEIELKKRVNSSISYEVEAQSIGRIFGLEHELINEGDTIKIK	320
ARW58514.1	241	IVDADAFQRWNEHGQHKFGFYTPETEELDMTPKRLLTLMEIELKKRVNSSISYEVEAQSIGRIFGLEHELINEGDTIKIK	320
ARW58396.1	241	IVDADAFQRWNEHGQHKFGFYTPETEELDMTPKRLLTLMEIELKKRVNSSISYEVEAQSIGRIFGLEHELINEGDTIKIK	320
AZF88360.1	241	IVDADAFQRWNEHGQHKFGFYTPETEELDMTPKRLLTLMEIELKKRVNSSISYEVEAQSIGRIFGLEHELINEGDTIKIK	320
YP 459979.1	241	IVDADAFORWNEHGOHKFGFYTPETEELDMTPKRLLTLMEIELKKRVNSSISYEVEAOSIGRIFGLEHELINEGDTIKIK	320
00037148.1	241	IVDADAFORWNEHGOHKFGFYTPETEELDMTPKRLLTLMEIELKKRVNSSISYEVEAOSIGRIFGLEHELINEGDTIKIK	320
ARW58457.1	241	IVDADAFORWNEHGOHKFGFYTPETEELDMTPKRLLTLMEIELKKRVNSSISYEVEAOSIGRIFDLEHELINEGDTIKIK	320
ABA46383.1	241	IVDADAFORWNEHGOHKFGFYTPETEELDMTPKRLLTLMEIELKKRVNSSISYEVEAOSIGRIFGLEHELINEGDTIKIK	320
YP 338198.1	241	IVDADAFORWNEHGOHKFGFYTPETEELDMTPKRLLTLMEIELKKRVNSSISYEVEAOSIGRIFGLEHELINEGDTIKIK	320
YP 512324.1	241	IVDADAFQRWNEHGQHKFGFYTPETEELDMTPKRLLTLMEIELKKRVNSSISYEVEAQSIGRIFGLEHELINEGDTIKIK	320
<u>QOQ37199.1</u>	321	DTGFTPALYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNK <mark>QEMIDQLDKLVQEANETASNAK</mark>	400
	201	DEADEDT VI DADIVITA ADDADEDDEADVODET DAVIDET DAVIDAT DAVIDAT DAVIDAT DAVIDAT DAVIDAT	
QOQ37255.1	321	DTGFTPELILEARVIAGDESFTDPTQDRIEFGDIREIVNQNEELRRIINRILSSLGNRQEMIDQLDRLVNEANETASNAK	400
QOQ37255.1 ARW58514.1	321 321	DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNKILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK	400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1	321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNKILSSLGNKQMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNKILSSLGNKQMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNKILSSLGNKQMIDQLDKLVNEANETASNAK	400 400 400
<u>ARW58396.1</u> AZF88360.1	321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNKILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK	400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP_459979.1	321 321 321 321 321 321	DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIQLDRLVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIQLDKLVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIQLDKLVQANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIQLDRLVQANETASNAK	400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1	321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIQQLDRLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIQQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIQQLDRLVQDANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIQQLDRLVQDANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIQQLDRLVQDANBTASNAK	400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1	321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNKILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANETASNAK	400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELTLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANETASNAK	$ \begin{array}{c} 400\\ 400\\ 400\\ 400\\ 400\\ 400\\ 400\\ 400$
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTDCDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK	$\begin{array}{c} 4 \ 0 \ 0 \\ 4 \ 0 \ 0 \\ 4 \ 0 \ 0 \\ 4 \ 0 \ 0 \\ 4 \ 0 \ 0 \\ 4 \ 0 \ 0 \\ 4 \ 0 \ 0 \\ 4 \ 0 \ 0 \\ 4 \ 0 \ 0 \\ 4 \ 0 \ 0 \end{array}$
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK	$\begin{array}{c} 4 0 0 \\ 4 0 0 \\ 4 0 0 \\ 4 0 0 \\ 4 0 0 \\ 4 0 0 \\ 4 0 0 \\ 4 0 0 \\ 4 0 0 \\ 4 0 0 \end{array}$
QOQ37255.1 ARW58514.1 AZF88360.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 AZF88366.1 AZF88366.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338196.1 YP 512324.1 QOQ37199.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK MTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEAMNPFTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPFTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIEXNPFTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 AZF83360.1 AZF83360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPFTGLKPFKTLWRDISNGKFGILKIWTGFAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPFTTGLKPFKTLWRDISNGKFGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEAMNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 YP 338198.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1 ARW58396.1 AZF88360.1 AZF88360.1 QOQ37148.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDLVVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDLVVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDLVVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDTKEIVNQNEELKRITNKILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEAMNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 YP 512324.1 YP 512324.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 AZF88360.1 XP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVVEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEAMNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQLDRLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQLDRLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQLDRLVQDANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQLDRLVQDANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQLDRLVQDANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQLDRLVVDANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQLDRLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQLDKLVNEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEAMNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN	$\begin{array}{c} 4 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\$
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 YP_338198.1 YP_338198.1 YP_512324.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1 QOQ37148.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVQDANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVQDANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPFTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPFTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTAEKVQENIKNNTVEIIESKNPFTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTAEKVQENIKNNTVEIIESKNPFTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTAEKVQENIKNNTVEIIESKNPFTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTAEKVQENIKNNTVEIIESKNPFTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTAEKVQENIKNNTVEIIESKNPFTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTAEKVQENIKNNTVEIIESKNPFTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTAEKVQENIKNNTVEIIESKNPFTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTAEKVQENIKNNTVEIIESKNPFTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTAEKVQENIKNNTVEIIESKNPFTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTAELKVQENIKNNTVEIIESKNPFTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN	$\begin{array}{c} 4 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\$
QOQ37255.1 ARW58514.1 AZW58396.1 AZF88360.1 VP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN	$\begin{array}{c} 4 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\$
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGRFGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGRFGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 YP 512324.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQAANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQAANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIEANNPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKFFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 VP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 P512324.1 VP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ABA46383.1 VP 512324.1 VP 512324.1 VP 512324.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDTKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANETASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANETASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPFTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 YP 512324.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58396.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW5856.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58314.1 ARW58314.1 ARW58314.1 ARW58314.1 ARW58396.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQUDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQUDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQUDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQUDLVVDANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQUDLVVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQUDLVVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQUDLVVDANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQUDKLVNBANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQUDKLVNBANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQUDKLVNBANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIOQUDKLVNBANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKTLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGFGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 YP_338198.1 YP_512324.1 YP_512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP_45979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP_512324.1 ARW58457.1 ABA4638.1 YP_512324.1 ARW58457.1 ABA4638.1 YP_512324.1 ARW58361.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 AZF88360.1 AZF88360.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNP	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 YP 512324.1 YP 512324.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58457.1 ARW5847.1 A	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYREIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFTSINENKQGEIDKKTKFEQDSSGFKTSIESLTKKDTEISSK KDIETTKTELNQKVQEAQNAATGGPN	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58561.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 512324.1 ZF838360.1 YP 459979.1 QOQ37255.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37255.1 ARW58396.1 AZF88360.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNTVEIIESKNPTTGL	400 400 400 400 400 400 400 400 400 480 48
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 YP_338198.1 YP_512324.1 YP_512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58314.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58514.1 ARW58451.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58396.1 YP_512324.1 YP_512324.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW558457.1 BR46202.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIYNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIYNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIYNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVVEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIYNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIYNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIYNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVVEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIYNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVVEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIYNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVVEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIYNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIYNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIYNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKLVNEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTIWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNTVEIIESKNPPTGLKPFKTIWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGL	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 YP 512324.1 YP 512324.1 YP 512324.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANBTASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANBTASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANBTASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANBTASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKEETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNTVEIIESKNP	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ARW58514.1 ARW58457.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNTVEIIE	400 400 400 400 400 400 400 400 400 480 48
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 YP_338198.1 YP_338198.1 YP_512324.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1 QOQ37148.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP_338198.1 YP_338198.1 YP_512324.1 QOQ37199.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW584514.1 ARW58396.1 AZF83360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 AR	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDFTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDLVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDTQDKYEEGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK DTGFTFELYLEARVIAGDESFTDTQDKYEFGDYKEIVNQNEELKRIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANBTASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTLWRDIS	400 400 400 400 400 400 400 400 400 480 48
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 P512324.1 YP 512324.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58451.1 YP 512324.1 YP 512324.1 YP 512324.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ARW584	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRISSLGNKQEMIDQLDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRISSLGNKQEMIDQLDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRISSLGNKQEMIDQLDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRISSLGNKQEMIDQLDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRISSLGNKQEMIDQLDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRISSUSPLOUDKSUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRISSLGNKQEMIDQLDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRISSUSPLOUDKSUNKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIEANNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPKSTLWRDISNGKPGILKIWT	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 YP 512324.1 YP 512324.1 YP 512324.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ARW58514.1 YP 512324.1 YP 512324.1 QOQ37148.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ARW5851.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW5851.1 YP 512324.1 YP 512324.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDYYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDYYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVQEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDXYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELRKIYNRILSSLGNKQEMIDQLDKUVNEANETASNAK VESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIEANNPPTTGLKPFKTINRDISNGKPGILKIWTGAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTINRDISNGKPGILKIWTGAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTINRDISNGKPGILKIWTGAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTINRDISNGKPGILKIWTGAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTINRDISNGKPGILKIWTGAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTINRDISNGKPGILKIWTGAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTINRDISNGKPGILKIWTGAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTINRDISNGKPGILKIWTGAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTINRDISNGKPGILKIWTGAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTINRDISNGKPGILKIWTGAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTINRDISNGKPGILKIWTGAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTINRDISNGKPGILKIWTGAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLK	400 400 400 400 400 400 400 400 480 480
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 YP 512324.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58396.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 YP 512324.1 YP 512324.1 YP 459979.1 QOQ37199.1 QOQ37148.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 A	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIUNQNEELKKIINKILSSLGMKQEMIQUDKUNNEANETASNAA DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIUNQNEELKKINNRILSSLGMKQEMIQUDKUNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIUNQNEELKKINNRILSSLGMKQEMIQUDKUNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIUNQNEELKKINNRILSSLGMKQEMIQUDKUNQANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIUNQNEELKKINNRILSSLGMKQEMIQUDKUNQANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIUNQNEELKKINNRILSSLGMKQEMIQUDKUNQANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIUNQNEELKKINNRILSSLGMKQEMIQUDKUNQANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIUNQNEELKKINNRILSSLGMKQEMIQUDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIUNQNEELKKINNRILSSLGMKQEMIQUDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIUNQNEELKKINNRILSSLGMKQEMIQUDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIUNQNEELKKINNRILSSLGMKQEMIQUDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIUNQNEELKKINNRILSSLGMKQEMIQUDKUNDEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIUNQNEELKKINNRILSSLGMKQENIQUDKUNDEANETASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTIWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTIWRDISNGKPGILKIWTFEQDSGFKTSIESLTKKDTEISNK KDIETTKTELNQKVQEAQNQATGGFNEVESLQGVSRTISNIENKQGEIDKKVTKFEQDSSGFKSIESLTKKDTEISNK KDIETTKTELNQKVQEAQNAAGGFNEVKESLQGVSRTISNIENK	400 400 400 400 400 400 400 400 400 480 48
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 P512324.1 YP 512324.1 YP 512324.1 YP 512324.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58396.1 YP 459979.1 QOQ37199.1 QOQ37148.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ARW578457.1 ARW578457.1 ARW578457.1 ARW578457.1 AR	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTPELIYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGMKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGTTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGMKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGTTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGMKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGTTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGMKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGTTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGMKQEMIDQLDKLVQDANETASNAK DTGTTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGMKQEMIDQLDKLVVQDANETASNAK DTGTTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGMKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGTTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGMKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGTTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGMKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGTTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGMKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGTTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGMKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK DTGTTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGMKQEMIDQLDKLVNEANETASNAK KESEAKALAEKVQENIKNNTVDIIEMNPPTTGLKPFKTURDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTURDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTURDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTURDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTURDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTURDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTURDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTURDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTURDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTURDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTURDISNGKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKLAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTURDISNKKPGILKIWTGTAWESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKLAEKVQENQAGQONGGOFNEVESLQGVSRTISNIENKQGEIDKKVTKFEQDSSGFKSIESLTKKDEISNK KDIETTKTELNQKVQEAQNAAGOFNEVGEGUGVSRTISNIENKQGEIDKKVTK	400 400 400 400 400 400 400 400 400 480 48
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 YP 512324.1 YP 512324.1 YP 512324.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGNKQENIQQLDKLWNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGNKQENIQQLDKLWNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGNKQENIQQLDKLVQDANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGNKQENIQQLDKLVQDANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGNKQENIQQLDKLVQDANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGNKQENIQQLDKLVQDANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGNKQENIQQLDKLVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGNKQENIQLDKLVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGNKQENIQLDKLVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGNKQENIQLDKLVNEANETASNAK DTGFTPELYLEARVIAGDESFTDPTQDKYEFGDYREIVNQNEELKKIYNRILSSLGNKQENIQLDKLVNEANETASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVDIIEANNPPTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTLWRDISNGKPGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTLWRDISNGKFGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEISKIPPTGKLPFKTLWRDISNGKFGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEISKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKFGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEISKNPTTGLKPFKTLWRDISNGKFGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEISKNPTTGKAPFKTLWRDISNGKFGILKIWTGTAMESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEISKNPTTGKAPFKTLW	400 400 400 400 400 400 400 400 400 400
QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 YP 512324.1 YP 512324.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37148.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 512324.1 YP 512324.1 YP 512324.1 YP 512324.1 ARW58514.1 ARW58314.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 512324.1 ARW58314.1 ARW58314.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1	321 321 321 321 321 321 321 321 321 321	DIGFTPELIVLEARVIAGDESTIDTUQUKIEFGUYREIUNQNEELKKIINKILSSLONKQEMIDQUDKUVREANETASNAK DTGTTPELIVLEARVIAGDESTIDTUQUKIEFGUYREIUNQNEELKKIINKILSSLONKQEMIDQUDKUVREANETASNAK DTGTTPELVLEARVIAGDESTIDTUQUKIEFGUYREIUNQNEELKKIINKILSSLONKQEMIDQUDKUVDKANETASNAK DTGTTPELVLEARVIAGDESTIDTUQUKIEFGUYREIUNQNEELKKIINKILSSLONKQEMIDQUDKUVQAANETASNAK DTGTTPELVLEARVIAGDESTIDTUQUKIEFGUYREIUNQNEELKKIINKILSSLONKQEMIDQUDKUVQAANETASNAK DTGTTPELVLEARVIAGDESTIDTUQUKIEFGUYREIUNQNEELKKIINKILSSLONKQEMIDQUDKUVQAANETASNAK DTGTTPELVLEARVIAGDESTIDTUQUKIEFGUYREIUNQNEELKKIINKILSSLONKQEMIDQUDKUVNEANETASNAK DTGTTPELVLEARVIAGDESTIDTUQUKIEFGUYREIUNQNEELKKIINKILSSLONKQEMIDQUDKUVNEANETASNAK DTGTTPELVLEARVIAGDESTIDTUQUKIEFGUYREIUNQNEELKKIINKILSSLONKQEMIDQUDKUVNEANETASNAK DTGTTPELVLEARVIAGDESTIDTUQUKIEFGUYREIUNQNEELKKIINKILSSLONKQEMIDQUDKUVNEANETASNAK DTGTTPELVLEARVIAGDESTIDTUQUKIEFGUYREIUNQNEELKKIINKILSSLONKQEMIDQUDKUVNEANETASNAK KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIEANNPTTGLKPFKTIMRDISNCKPGILKINTGANESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTIMRDISNCKPGILKINTGANESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTIMRDISNCKPGILKINTGANESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTIMRDISNCKPGILKINTGANESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTIMRDISNCKGILKINTGANESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTTGLKPFKTIMRDISNCKGILKINTGANESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTIMRDISNCKGILKINTGANESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPPTGLKPFKTIMRDISNCKGILKINTGANESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTIMRDISNCKGILKINTGANESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTIMRDISNCKGILKINTGANESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTIMRDISNCKGILKINTGANESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTIMRDISNCKGILKINTGANESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPFKTIMRDISNCKGILKINTGANESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPKTIMRDISNCKGILKINTGANESVVPDVESVKKETLDQVN KESEAAKALAEKVQENIKNNTVEIIESKNPTTGLKPKTIMRDISNCKGILKIN	400 400 400 400 400 400 400 400 400 480 48

ARW58457.1	001	TNIAF21AF61VVII2DIA2DI12TVÄLLIFIVFÄAGVI2FVF12AF71DNWVIGAÄNLIVÄV2Ldaadel	632
ABA46383.1	561	VNTIESTVEGTKKTISDVQQTTSDLKKTTTEIKEEAGKISEKLMSVETKVNSDKAGGRNLLLGS	624
YP_338198.1	561	VNTIESTVEGTKKTISDVQQTTSDLKKTTTEIKEEAGKISEKLMSVETKVNSDKAGGRNLLLGS	624
YP_512324.1	561	VNTIESTVEGTKKTISDVQQTTSDLKKTTTEIKEEAGKISEKLMSVETKVNSDKAGGRNLLLGS	624
<u>QOQ37199.1</u>	623	MVGGAQVNKAKFAVQ	645
Q0Q37255.1	623	MQRPQTIGSFNSFNSFNSFN	645
ARW58514.1	627	QNELFSWYADE	649
ARW58396.1	633	TVKYDENNKWWditipvgas-gswkgILYNNKNAKLLVGRAYTISYEIYADE	683
AZF88360.1	633	TVKYDENNKWWditipvgas-gswkgILYNNKNAKLLVGRAYTISYEIYAEE	683
YP_459979.1	637	LFKFVDVNISEasaikkglqitsnkaFVYQKLPADVFKKKKGIASCYINVSS	688
<u>Q0Q37148.1</u>	633	arwgsygTISVIKESSLPslptpgslvietkvngaeqavpn-gtqvgMRSSDRKFKVKKGQKYTVSFNVATSElgwlldy	711
ARW58457.1	633	TVKYDENNKWWditipvgas-gswkgILYNNKNAKLLVGRAYTISYEIYADE	683
ABA46383.1	625	INQYSLTENFFAGEEYTFVIKGSVPQ	660
YP_338198.1	625	INQYSLTENFFAGEEYTFVIKGSVPQ	660
<u>YP_512324.1</u>	625	INQYSLTENFFAGEEYTFVIKGSVPQ	660
	<i></i>		
<u>Q0Q37199.1</u>	646	PgEYIVLecSDHTDSFYQFHLDNTKMGDFEKSKDMTLSLDLQNDvhvdFIlfqinGVWSENVQKGVPASN-V	717
<u>Q0Q37255.1</u>	646	E-DYMIVecTDHTDSFYQFHLDNTKMGDYEKGKDMTFSIDLQNDvpidLiviqtinGVWTENLYSRFPVDN	/15
ARW58514.1	650	K-VIKFIPRDGESGGVIQRVGAKGNSTVTVPFEKEQDIVVTVWLKSSnanqkLKISAEGLKSQFVNVGKV	/18
ARW58396.1	684	V-IPTAIDINNFGVATSTGTNDNDVVARRIMRTPRTIAGOWVKVSATFIMPDNITQDFYDNSVI	746
AZF88360.1	684	V-IPTAIDINREVATSTGTNDNDVVAKRIMRTPKTIAGUWKVSATFIMPDNITQDFYDDSVI	746
<u>1P_459979.1</u>	689	F-TP-GT-DYP	745
QOQ37148.1	/12	I-YIMYT-DNANQRIPT-INTLDFPIIAKINDRENNI-CONWUC DTRVKFTTATKDD-DNAIL	764
ARW36437.1	004		740
ABA40303.1	001	G-QKFGI-WQNGQSSNVGIAISVIANGIIIVI-FRAVATISGNERLSINIPSNIIKAIVE	719
VD 512224 1	661		710
<u>IP_512524.1</u>	001	G-QAFGIWQNQQSSNVGIAISVIANGIIIVIFRAVAIISGNERALSLINIPSNIIRAIVE	/19
00027100 1	710		770
00037255 1	716	wartewstindermanswyrtaraaninstykliffantaleagalfiDFSRSTIELEQSV wsrrefffkidSBarcwalBleFEDDEnstyklyrfwyatevsteversus	110 776
2020/200.1	710	TETETETATUSALUMATUMATUKAN EAM - TENSAKAKAYI ANARABARGOVI	720
ARW50514.1	713	WARNELKINGCOUNCE THE TAD	000
ARW30350.1	747		800
ND 450070 1	747		700
<u>1F_4JJJJ7J.1</u>	740		199
<u>QUQ37140.1</u> ADW59457_1	700	CUCICUM TRALIGNIGYAWIK TRALIGNIGYAWIK TRALAVERGITAT DWDASNNDKYSLEVFEQATIDIERSY	023
ARWJ04J7.1	720		756
ABA40303.1	720	VALIGGREPOWIPAPEOVITUEFIKKIIEIIKSV	750
VD 512224 1	720		756
<u>IF_J12J24.1</u>	120	VALIKGWARQDWIFAFEEQVIIDEFIKKIIEIIKSV	/50
00037199 1	779		858
00037255 1	777	DORALLA LIA ANDEONO BENDALA DA COL SALANSI NININISI NININI DOVLA LOVALA LOVALA LA NA ANDE	856
DW58514 1	790	DOKKTI VSIVQDOQ OVERKINGI I VQQ HAOGIDI I VSSDINIM VSDQOKKI TEXNIKLE DOADA I COKUT KOVEDVVA CEK	869
ARW50314.1	801	DOKKTI ALMANGON CEEKONGNUK OWARCI SEMIKINI NIMIKI ODOKKT MENIMIKI EOOMATI CIKUFI KONEDVUN CEK	880
AZE88360 1	801	DGVKTTVTNVQNOQAGEEKEMGNVEGTATGLISSTVSNLNNVSDQGKKTTEANTKLEQQATATGAKVELKQVEDIVAGEK	880
VP 459979 1	800		879
00037148 1	824	EGIKTTVTKVODSOAGFEREMSTVEOTASGLSSTVSNLNNVVSDOGKKLTEANTKIEOOATAIGAKVELKOVEDVVAGFK	903
ARW58457.1	801	DGIKETITKVENNOSGFENRVATVEKDATSIKONVSLIONTOTEOGKOLOEAKAGWENTAKALEGKVELKOVEDYVAGEK	880
ABA46383.1	757	DGIKETITKVENNÖSGEDKRVATVEKDATAIKONVSLIONTOTEOGROLOEAKAGWENTAKALEGKVELKÖVEDYVAGEK	836
YP 338198.1	757	DGIKETITKVENNÖSGEDKRVATVEKDATAIKONVSLIONTOTEOGROLOEAKAGWENTAKALEGKVELKÖVEDYVAGEK	836
YP 512324.1	757	DGIKETITKVENNÖSGEDKRVATVEKDATAIKONVSLIONTOTEOGROLOEAKAGWENTAKALEGKVELKÖVEDYVAGEK	836
00037199.1	859	IPELKOTVNONKODLLNELANKLATEOFNOKMTLIDNRFIINEEGLNAAAKKTEVYTKTOADGOFAKDSYVRDMESRLOL	938
00037255.1	857	IPELKOTVNONKODLLNELANKLATEOFNOKMTLIDNRFTINEOGINAAAKKTEVYTKTOADGOFAADSYVRDMESRLOI	
ARW58514.1	870	IPELKQTVDKNKQDLLGELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMESRLQL	936
ARW58396.1	881		936 949
AZF88360.1	881	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL	936 949 960
YP_459979.1		IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTMIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTRIQADGQFAKDSYVRDMESRLQL	936 949 960 960
QOQ37148.1	880	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTMIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKIQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVDKNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGGFATDSYVRDMESRLQL	936 949 960 960 959
	880 904	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTMIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTRIQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVDKNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTIEQANGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINELGINAAAKKTEVYTIEQANGQFAKDSYVRDMETRLQL	936 949 960 960 959 983
ARW58457.1	880 904 881	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTMIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTRIQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVDKNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTMIDNRFTINELGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTMIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL	936 949 960 960 959 983 960
ARW58457.1 ABA46383.1	880 904 881 837	PELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINELGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINELGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINELGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINELGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL	936 949 960 959 983 960 916
ARW58457.1 ABA46383.1 YP_338198.1	880 904 881 837 837	PELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVDKNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL	936 949 960 959 983 960 916 916
ARW58457.1 ABA46383.1 YP_338198.1 YP_512324.1	880 904 881 837 837 837	PELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL	936 949 960 959 983 960 916 916 916
ARW58457.1 ABA46383.1 YP_338198.1 YP_512324.1	880 904 881 837 837 837	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINELGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL	936 949 960 959 983 960 916 916 916
ARW58457.1 ABA46383.1 YP_338198.1 YP_512324.1 QOQ37199.1	880 904 881 837 837 837 939	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL	936 949 960 959 983 960 916 916 916 1018
ARW58457.1 ABA46383.1 YP_338198.1 YP_512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1	880 904 881 837 837 837 939 939	PELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	936 949 960 959 983 960 916 916 916 1018 1018
ARW58457.1 ABA46383.1 YP_338198.1 YP_512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1	880 904 881 837 837 837 939 939 937 950	PELKQTVNQNKQDLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPEKQVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARSF	936 949 960 959 983 960 916 916 1018 1018 1016
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 <u>QOQ37199.1</u> <u>QOQ37255.1</u> ARW58514.1 ARW58396.1	880 904 881 837 837 837 939 939 937 950 961	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IFEKQTSISVKENDVIAAKINKSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAFNMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF	936 949 960 959 983 960 916 916 1018 1018 1018 1029 1040
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 AZF88360.1	880 904 881 837 837 837 939 937 950 961 961	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFAKDSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPEKGVSISVKENDVIAAINKSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF	936 949 960 959 983 960 916 916 916 1018 1018 1029 1040
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 yP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YF 459979.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 961 960	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVADMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVADMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVADMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVADMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVADMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVADMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVADMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPEKQTSISVENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF	936 949 960 959 983 960 916 916 916 1018 1018 1029 1040 1040 1039
ARW58457.1 ABA46383.1 YP_338198.1 YP_512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP_459979.1 QOQ37148.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 961 960 984	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IFEKGVSISVKENDVIAAFNMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAFNMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	936 949 960 959 983 960 916 916 1018 1016 1029 1040 1039 1063
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 961 960 984 961	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVVTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IFEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	936 949 960 959 983 960 916 916 1018 1016 1029 1040 1039 1040
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 960 984 961 917	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVADMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVADMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVADMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVADMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVADMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVADMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPEKQVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	936 949 960 959 983 960 916 916 916 1018 1016 1029 1040 1039 1063 1040 996
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 yP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 960 984 961 917 917	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVADMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPEKQVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLISGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	936 949 960 959 983 960 916 916 916 1018 1018 1029 1040 1040 1040 996 996
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 961 961 961 961 917 917	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATOSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL ITEKGVSISVKENDVIAAFINKSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAFINKSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	936 949 960 959 916 916 916 916 1018 1016 1029 1040 1030 1040 996 996 996
ARWS8457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58596.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 960 984 961 917 917	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	936 949 960 959 983 916 916 916 916 1018 1012 1040 1040 1040 1040 996 996
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37199.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 960 984 961 917 917 917 1019	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVADMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IFEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	936 949 960 959 983 916 916 916 916 1018 1016 1022 1040 1040 1040 996 996 996 996
ARW58457.1 ARW58457.1 ARW583.1 YP_338198.1 YP_512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP_512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 QOQ37255.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 961 961 961 917 917 917 917 917	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IFEKGVSISVKENDVIAAFNNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAFNNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	9366 949 960 959 983 960 916 916 916 916 1012 1040 1032 1040 996 996 996 1098 1098
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58596.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 960 961 960 984 961 917 917 917 917	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IFEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	9369960 9499960 9599983 96009169916 916916 916916 101221040 1040010391040 99699996 10981096 10981096
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 YP 338198.1 YP 338198.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 	880 904 881 837 837 939 937 950 961 961 961 961 961 917 917 917 1019 1017 1030 1041	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVADMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IFEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	936 949 960 950 959 983 960 916 916 916 916 1018 1016 1029 1040 1035 1040 996 996 1098 1098 1098
ARW58457.1 ARW58457.1 ARW583.1 YP_338198.1 YP_512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP_512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58596.1 AZF88360.1 AZF88360.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 960 984 961 917 917 917 1019 1017 1019	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IFEKGVSISVKENDVIAAFNNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAFNNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	9369 9499 960 959 960 959 916 916 916 916 916 1012 1040 1040 1040 996 996 996 1098 1098 1098 1098
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QQQ37199.1 QQQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QQQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 38198.1 YP 512324.1 QQQ37199.1 QQQ37199.1 QQQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YF 459979.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 961 961 961 917 917 917 1019 1017 1030 1041 1041	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL ITEKGVSISVKENDVIAAFNKSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAFNKSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	9369 949 960 950 959 960 959 960 916 916 916 916 916 916 916 1022 1040 1032 1040 996 996 996 996 10098 10008 10098 10008 10098 10008 10008 10008 10008 10008 10008 10008 10000
ARWS8457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37255.1 ARWS8514.1 ARW58596.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 QOQ37148.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58396.1 YF 459979.1 QOQ37148.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 961 960 984 961 917 917 917 1019 1017 1030 1041 1040 1064	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVADMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	936 949 960 950 950 983 916 916 916 916 1012 1040 1040 1040 1039 1063 1046 996 996 1098 1098 1098 1109 1120 1121
ARW58457.1 ARW58457.1 ARW583.1 YP_338198.1 YP_512324.1 QQQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QQQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58361.1 AZF88360.1 YP 512324.1 P512324.1 QQQ37148.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW5857.1 NP 459979.1 QQQ37148.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 960 984 960 984 960 917 917 917 1019 1017 1030 1041 1041 1041	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF	9366 949 960 950 959 983 9960 916 916 916 916 916 1012 1042 1042 1042 1042 996 9996 10996 10996 10996 10996 10996 10996 10996 10921 1041 104
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW5861.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1	880 904 881 837 837 939 950 961 961 960 984 961 917 917 917 1019 1017 1030 1041 1041 1044 1041 997	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATOSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL ITEKGVSISVKENDVIAAFNKSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAFNKSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAFNKSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKL	936 949 960 959 983 960 916 916 916 916 916 1012 1042 1042 1042 1042 1042 1042 1042
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58596.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58396.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 338198.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 960 984 961 917 917 917 1019 1017 1030 1041 1041 1040 1064 1041 997 997	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVADMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSK	9366 949 960 950 950 959 916 916 1016 1022 1040 1040 1040 1040 996 996 996 996 1098 1098 1098 1099 1120 1109 1122 1143 1122 076
ARW58457.1 ARW58457.1 ARW583.1 YP_338198.1 YP_512324.1 QOQ37199.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YF 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP_338198.1 YP_512324.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP_512324.1 YP_31818.1 YP_512324.1	880 904 881 837 837 939 950 961 960 984 961 917 917 917 1019 1017 1030 1041 1041 1041 1041 1044 1041 997 997	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVADMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IFEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINM	9366 949 960 950 959 959 916 916 916 916 916 1022 1040 1032 1040 1032 996 1099 1009 1009 1009 1109 1120 1143 1120 1143 1127 1076
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QQQ37199.1 QQQ37255.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QQQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 QQQ37199.1 QQQ37199.1 QQQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58596.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QQQ37148.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 QQQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 QQQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 ARW582457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 CO027148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 CO027148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 CO027148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 CO027148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 CO027148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 CO027148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 CO027148.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58514.1 ARW58457.1 ARW58457.1 ARW58514.1 ARW58457.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 961 960 984 961 917 917 917 1019 1017 10301 1041 1041 1041 1041 997 997	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IFEKGYSISVKENDVIAAFNMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAFNMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYEKGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGYSISVKENDVIAAINMSKENIKLN	9366 949 960 959 959 959 916 916 916 916 916 1022 1042 1042 1042 1042 1042 1042 1042
ARW58457.1 ABA46383.1 YP 338198.1 YP 512324.1 QOQ37255.1 ARW58514.1 ARW58514.1 ARW58396.1 AZF88360.1 YP 459979.1 QOQ37148.1 ARW58457.1 ABA46383.1 YP 512324.1 YP 512324.1	880 904 881 837 837 939 937 950 961 961 961 917 917 917 917 1019 1019 1041 1041 1041 1041 1041 1041	IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFIINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVADMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFAKDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMESRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATDSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPELKQTVNQNKQDLLDELANKLATEQFNQKMTLIDNRFTINEQGINAAAKKTEVYTKTQADGQFATGSYVRDMETRLQL IPEKQVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARSF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINNSKENIKLNAARIDLVGKVNAEWIKAGLLSGCQIRTSNTDNYVSLDDQFIRLYERGVARAF TEKGVSISVKENDVIAAINN	9366 949 960 960 959 983 960 916 916 916 916 1042 1042 1042 1042 1042 1042 1042 1042

ARW58514.1	1110	FYAGNGSWYFRRGKVGLYQTSLVVEDNGTDSDLRLPNITLRNSRAAGYTGIIQVKSPVTQNGWGSVQGNFMSPSLREYKS	1189
ARW58396.1	1121	FYAGNGSWYFRRGKPGLYQTSLVVEDNSTDSDLRLPNVTIRNSRAAGYTGVIQLKSPVTQNGWGAVQGNFMTPSLREYKS	1200
AZF88360.1	1121	FYAGSGSWYFRRGKPGLYQTSLVVEDNSTDSDLRLPNVTIRNSRAAGYTGVIQLKSPVTQNGWGAVQGNFMTPSLREYKS	1200
YP_459979.1	1120	FYAGNGNWYFRRGKPGLYQTSLVVEDNSTDSDLRLPNVTIRNSRAAGYTGVIQLKSPVTQNGWGAVQGNFMTPSLREYKS	1199
QOQ37148.1	1144	FYAGNGSWYFRRGKTGLYQTSLVLEDNGTDSDLRLPNVTIRNSRAAGYTGVIQLKSSVTQNGWGAVQGNFMTPSLREYKS	1223
ARW58457.1	1121	FYAGNGSWYFRRGKPGLYQTSLVVEDNSTDSDLRLPNVTIRNSRAAGYTGVIQLKSPVTQNGWGAVQGNFMTPSLREYKS	1200
ABA46383.1	1077	FYAGNGNWYFRRGKPGLYQTSLVVEDNSTDSDLRLPNVTIRNSRAAGYTGVIQLKSPVTQNGWGAVQGNFMTPSLREYKS	1156
YP 338198.1	1077	FYAGNGNWYFRRGKPGLYQTSLVVEDNSTDSDLRLPNVTIRNSRAAGYTGVIQLKSPVTQNGWGAVQGNFMTPSLREYKS	1156
YP_512324.1	1077	FYAGNGNWYFRRGKPGLYQTSLVVEDNSTDSDLRLPNVTIRNSRAAGYTGVIQLKSPVTQNGWGAVQGNFMTPSLREYKS	1156
QOQ37199.1	1179	NIRDVSFSALEKIRNLKIRQFNYKNAVNELYQMREEKDPNDPPLTTQDIKTYYGVIVDEADEDFIDESGKGIHLYSYASI	1258
QOQ37255.1	1177	NIRDVSFSALEKIRNVRVREFNYKNAVNELYKMREEKDPNDPPLTIQDIKTYYGAIVDESDEAFIDESGKGIHLYSYASL	1256
ARW58514.1	1190	NIRDVSFSALEKIRNVRVREFNYKNAVNELYKMREEKDPNDPPLTIQDIKTYYGAIVDESDEAFIDESGKGIHLYSYASL	1269
ARW58396.1	1201	NIRDIPFSALEKIRSLKIRQFNYKNAVNELYRMREEKSPNDPPLTTEDIKTYYGLIVDECDEMFVDESGKGIHLYSYASI	1280
AZF88360.1	1201	NIRDIPFSALEKIRSLKIRQFNYKNAVNELYKMREEKSPNDPPLTIEDIKTYYGLIVDECDEMFVDESGKGIHLYSYASI	1280
YP_459979.1	1200	NIRDISFSALEKIRSLKIRQFNYKNAVNELYRMREEKSPNDPPLTTEDIKTYYGLIVDECDEMFVDESGKGIHLYSYASI	1279
QOQ37148.1	1224	NIRDISFSALEKIRSLKIRQFNYKNAVNELYRMREERSPNAPPLTTEDIKTYYGLIVDECDEMFVDESGKGIHLYSYASI	1303
ARW58457.1	1201	NIRDIPFSALEKIRSLKIRQFNYKNAVNELYRMREEKSPNDPPLTTEDIKTYYGLIVDECDEMFVDESGKGIHLYSYASI	1280
ABA46383.1	1157	NIRDISFSALEKIRSLKIRQFNYKNAVNELYRMREEKSPNDPPLTTEDIKTYYGLIVDECDEMFVDESGKGIHLYSYASI	1236
YP_338198.1	1157	NIRDISFSALEKIRSLKIRQFNYKNAVNELYRMREEKSPNDPPLTTEDIKTYYGLIVDECDEMFVDESGKGIHLYSYASI	1236
YP_512324.1	1157	NIRDISFSALEKIRSLKIRQFNYKNAVNELYRMREEKSPNDPPLTTEDIKTYYGLIVDECDEMFVDESGKGIHLYSYASI	1236
QOQ37199.1	1259	GIKGLQEVDEEVQEQKVEIANLKSQVASQENRIAQLEE-LLQQLIDKKPEQP 1309	
QOQ37255.1	1257	TVKALQEVDATVQEQEGEIANLKSQVASQEDRIARLEELLLQQLIDKKPEQP 1308	
ARW58514.1	1270	TVKALQEVDATVQEQEGEIANLKSQVASQEDRIARLEELLLQQLIDKKPEQP 1321	
ARW58396.1	1281	GIKGLQEVDATVQEQEVEIANLKSQIASQEDRIARLEELLLQKLINEKPEQP 1332	
AZF88360.1	1281	GIKGLQEVDATVQEQEVEIENLKSKVASQEDRIARLEELLLQRLINKKPEQP 1332	
YP_459979.1	1280	GIKGLQEVDATVQEQEVEIANLKSQIASQEDRIARLEELLLQQLINKKPEQP 1331	
QOQ37148.1	1304	GIKGLQEVDATVQEQEVEIENLKSQVASQEDRIARLEELLLQQLIDKKPEQP 1355	
ARW58457.1	1281	GIKGLQEVDATVQEQEVEIANLKSQIASQEDRIARLEELLLQKLINKKPEQL 1332	
ABA46383.1	1237	GIKGLQEVDATVQEQEVEIANLKSQIASQEDRIARLEELLLQQLINKKPEQP 1288	
YP_338198.1	1237	GIKGLQEVDATVQEQEVEIANLKSQIASQEDRIARLEELLLQQLINKKPEQP 1288	
YP_512324.1	1237	GIKGLQEVDATVQEQEVEIANLKSQIASQEDRIARLEELLLQQLINKKPEQP 1288	

Spis rysunków

Rycina 1. Liczba przypadków zakażeń laseczką wąglika zgłoszonych w krajach Unii Europejskiej w latach 2007-2021 (**str. 14**).

Rycina 2. Rodzaje morfologii fagów z podziałem na występowanie materiału genetycznego w wirionach (**str. 18**).

Rycina 3. Morfologia fagów na przykładzie faga ogonkowego o morfotypie myowirusa (lewa strona obrazu) i siphowirusa (prawa strona obrazu) (**str. 19**).

Rycina 4. Schematyczne przedstawienie pięciu rodzajów aktywności enzymatycznej endolizyn fagowych (**str. 24**).

Rycina 5. Miejsca cięcia peptydoglikanu przez endolizyny o różnej aktywności enzymatycznej (str. 24).

Rycina 6. Zasada tworzenia regionów komplementarnych dla fragmentów poddawanych ligacji w reakcji Gibson Assembly (**str. 48**).

Rycina 7. Schemat mechanizmu klonowania w reakcji Gibson Assembly (str. 49).

Rycina 8. Mapa plazmidu pET-30a(+) wraz z zaznaczeniem regionów różniących się w wariantach pET-30b(+) i pET-30c(+) (**str. 50**).

Rycina 9. Symulacja klonowania GA *in silico* w programie SnapGene na przykładzie genu kodującego lizynę z faga J5a klonowanego do plazmidu pET-30c(+) (**str. 52**).

Rycina 10. Regiony zawierające wstawkę i powielane w reakcjach PCR (wspólne dla trzech klonowanych genów) (str. 57).

Rycina 11. Przykładowe obrazy żeli agarozowych przedstawiające rozdział genomów fagów J5a, F16Ba i z1a w PFGE (**a**) oraz różne wzory trawień restrykcyjnych DNA fagów J5a, F16Ba, 2C i z1a przy użyciu enzymów HaeIII i EcoRV (**b**) (**str. 65**).

Rycina 12. Obrazy przedstawiające fagi: J5a (**a**), F16Ba (**b**) i z1a (**c**), wykonane za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (**str. 65**).

Rycina 13. Parametry fizjologiczne fagów J5a, F16Ba i z1a: krzywe adsorpcji (a) oraz krzywe jednostopniowego wzrostu (b) (**str. 66**).

Rycina 14. Przeżywalność fagów J5a, F16Ba i z1a po inkubacji w różnych warunkach pH (str. 67).

Rycina 15. Stabilność termiczna fagów J5a, F16Ba i z1a po inkubacji przez różny czas w różnych temperaturach (**str. 67**).

Rycina 16. Porównanie schematycznych map genomów fagów J5a, F16Ba i z1a (str. 68).

Rycina 17. Produkt reakcji PCR ze starterami komplementarnymi do przewidzianych przeciwległych rejonów blisko końców DNA wirionu i skierowanymi odpowiednio w stronę każdego z końców tak, by wykryć obecność fragmentu o długości 585 bp otaczającego sekwencję *cos* w fagach J5a, F16Ba i z1a (**str. 69**).

Rycina 18. Różnice we wzorach migracji zdenaturowanych i niezdenaturowanych fragmentów DNA fagów J5a, F16Ba i z1a uzyskanych po trawieniu i rozdziale elektroforetycznym w 1% żelu agarozowym (**str. 70**).

Rycina 19. Wzory trawień restrykcyjnych wygenerowane *in silico* przy użyciu programu SnapGene dla DNA fagów Lambda, J5a, F16Ba i z1a, ukazujące oczekiwane różnice między trawionym DNA niepoddanym obróbce i poddanym działaniu wysokiej temperatury (formy liniowe) (**str. 70**).

Rycina 20. Porównanie całych genomów oraz zgrupowanie fagów J5a, F16Ba, z1a i ich najbliższych krewnych (**str. 86**).

Rycina 21. Analiza filogenetyczna fagów J5a, F16Ba, z1a i najbliżej spokrewnionych fagów na podstawie podobieństwa sekwencji całych proteomów obliczonego przez tBLASTx, przeprowadzona przy użyciu programu ViPTree [114] (**a**); drzewo filogenetyczne wygenerowane na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowej głównego białka kapsydu (**b**); drzewo filogenetyczne wygenerowane na podstawie podobieństwa dużej podjednostki terminazy (**c**) (str. 87).

Rycina 22. Syntenia genów w genomach fagów J5a, F16Ba, z1a oraz znanych lub proponowanych przedstawicieli rodzaju *Wbetavirus* (**str. 88-89**).

Rycina 23. Żele agarozowe przedstawiające wektor pET30-c(+) (**a**) oraz wstawki (**b**), jako produkty PCR służące do ligacji (**str. 96**).

Rycina 24. Zdjęcia żeli agarozowych ukazujących fragmenty DNA między promotorem a terminatorem T7 wektora obejmujące sklonowane geny kodujące zmodyfikowane endolizyny fagów J5a, F16Ba i z1a (**str. 96**).

Rycina 25. Żel agarozowy ukazujący fragmenty DNA obejmujące sklonowane geny kodujące zmodyfikowane endolizyny fagów J5a, F16Ba i z1a, w transformantach TR: J3, J6, F1, F2, z1 i z2, po reakcji PCR z użyciem starterów T7PP i J5a_sekw_F (**str. 97**).

Rycina 26. Białka szczepu kontrolnego *E. coli* BL21 oraz szczepów zawierających plazmidy z wklonowanymi genami zmodyfikowanych endolizyn po rozdziale w żelu poliakrylamidowym z SDSem próbek pobranych z zaindukowanych hodowli trzech transformantów (**str. 98**). **Rycina 27.** Przykłady obrazów żeli SDS-PAGE z rozdziałem kolejnych frakcji białkowych w procesie oczyszczania zmodyfikowanych endolizyn LysJ (**a**) i LysF (**b**) (**str. 98**).

Rycina 28. Obrazy żeli poliakrylamidowych przedstawiające oczyszczone i zagęszczone zmodyfikowane lizyny LysJ (**a**) i LysF (**b**). Marker wielkości Perfect Tricolor Protein Ladder (**str. 99**).

Rycina 29. Obraz zmodyfikowanych lizyn LysJ (**a**) i LysF (**b**) w membranie PVDF po elektrotransferze z żelu SDS-PAGE oraz detekcji w reakcji z przeciwciałami penta His HRP Conjugate metodą Western Blotting (**str. 99**).

Rycina 30. Obraz przejaśnień w zymogramie wskazujący na działanie zmodyfikowanych lizyn LysJ i LysF wobec ściany komórkowej szczepu *B. anthracis* 34F2 (**str. 100**).

Rycina 31. Strefy przejaśnienia w murawce *B. anthracis* 34F2 na skutek działania zmodyfikowanej lizyny LysJ o różnych stężeniach po ok. 6 godz. (**a**) i 72 godz. (**b**) (str. 100).

Rycina 32. Strefy przejaśnienia w murawce *B. anthracis* 34F2 na skutek działania zmodyfikowanej lizyny LysF o różnych stężeniach po ok. 4 godz. (**str. 101**).

Rycina 33. Wpływ zmodyfikowanych lizyn LysJ (**a**) i LysF (**b**) na gęstość optyczną komórek niezjadliwego szczepu *B. anthracis* 34F2 (**str. 102**).

Rycina 34. Wpływ zmodyfikowanej lizyny LysJ na gęstość optyczną zawiesin komórek zjadliwych szczepów *B. anthracis* (**str. 103**).

Rycina 35. Wpływ zmodyfikowanej lizyny LysF na gęstość optyczną zawiesin komórek zjadliwych szczepów *B. anthracis* (**str. 104**).

Rycina 36. Wpływ zmodyfikowanych lizyn LysJ i LysF na gęstość optyczną zawiesin komórek wybranych szczepów z rodzaju *Bacillus* (**str. 105-106**).

Rycina 37. Porównanie sekwencji pierwszo- i drugorzędowych zmodyfikowanych endolizyn LysJ i LysF (str. 107).

Spis tabel

Tabela 1. Śmiertelność po drugim dniu od zakażenia laseczką wąglika (str. 16).

Tabela 2. Lista szczepów bakteryjnych użytych w badaniach (str. 32).

Tabela 3. Lista starterów użytych do amplifikacji wstawek oraz wektora do reakcji klonowania (str. 51).

Tabela 4. Objętości składników zalecane dla przeprowadzenia reakcji klonowania metodą Gibson Assembly (**str. 54**).

Tabela 5. Porównanie wydajności adsorpcji, wielkości plonu oraz czasów latencji dla fagów J5a, F16Ba i z1a (**str. 66**).

Tabela 6. Ogólne cechy genomów fagów J5a, F16Ba i z1a (str. 68).

Tabela 7. Przewidziane produkty białkowe genomu faga J5a i ich proponowane funkcje (str. 72).

Tabela 8. Przewidziane produkty białkowe genomu faga F16Ba i ich proponowane funkcje (str. 77).

Tabela 9. Przewidziane produkty białkowe genomu faga z1a i ich proponowane funkcje (str. 81).

Tabela 10. Wyniki analizy HHpred dla sekwencji przewidywanych białek faga J5a: Dit (J5a_014) (a), Tal/RBP (J5a_015) (b) i endolizyny (J5a_018) (c) wraz ze schematycznym pokazaniem lokalizacji rejonów strukturalnego podobieństwa ich sekwencji względem białek z bazy danych (**str. 90**).

Spis załączników

Załącznik 1. Wyniki analizy HHpred dla wybranych białek faga J5a – w większości hipotetycznych/konserwatywnych białek o nieznanej funkcji (**str. 138**).

Załącznik 2. Wyniki analizy HHpred dla hipotetycznych/konserwatywnych białek fagów F16Ba i z1a o nieznanej funkcji, niemające odpowiedników wśród białek faga J5a (**str. 140**).

Załącznik 3. Koordynaty nowo przypisanych CDS-ów w genomach fagów referencyjnych (str. 141).

Załącznik 4. Wartości identyczności wszystkich białek faga J5a względem białek pozostałych analizowanych fagów (str. 142).

Załącznik 5. Wpływ zmodyfikowanych lizyn LysJ i LysF na gęstość optyczną zawiesin komórek wybranych szczepów z rodzaju *Bacillus* – wykresy przedstawiające słabe działanie lizyn lub brak działania (**str. 147**).

Załącznik 6. Dopasowanie sekwencji aminokwasowych białek Tal/RBP (J5a_015 i jego odpowiedników) fagów J5a, F16Ba, z1a i innych fagów podobnych do Wbeta (**str. 149**).