



**NOTIFICACIÓN SOBRE OPERACIONES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE**

Nº de Registro:	Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

A. Notificador

- 1) Nombre y titulación del responsable de la notificación:

Prof. Juan Carlos Lacal Sanjuán
Profesor de Investigación (CSIC).

- 2) Centro, Institución o Empresa:

Centro Nacional de Biotecnología (CNB)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

- 3) Domicilio:

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)
Campus Universidad Autónoma. Cantoblanco
28049-Madrid

- 4) Persona de contacto:

Fernando Usera Mena
Responsable del Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica

Tel: 915854541
Fax: 915854506
Correo electrónico: fusera@cnb.uam.es



B. Instalación donde se va a desarrollar la operación de utilización confinada (sí previamente ha sido comunicada para este tipo de operaciones):

- 1) Fecha de comunicación de la notificación relativa a la instalación:

7/03/01

- 2) Número de Notificación:

A/ES/00/I-8

C. Información sobre el personal y su formación (Titulación y experiencia en el sector):

- 1) Responsable de la actividad de utilización confinada objeto de la notificación:

Prof. Juan Carlos Lacal Sanjuán, jefe del laboratorio 35 del CNB
Profesor de Investigación del CSIC (con 22 años de antigüedad como funcionario del CSIC)

- 2) Responsables de la vigilancia y/o control (sólo en el caso que sean diferentes que los notificados para el caso de las instalaciones):

Fernando Usera Mena, Doctor en Ciencias. Investigador Titular de Organismos Públicos de Investigación. Responsable del Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica del CNB desde 1993.



II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

Construcción segura de un lentivirus recombinante defectivo basado en el ViraPower™ Lentiviral Expression System (INVITROGEN # K4950), utilizando el vector pLenti6/V5 Directional TOPO® (INVITROGEN # K4955), que infecta células humanas, con objeto de expresar oncogenes en líneas celulares humanas y estudiar su efecto.

2) Clasificación de la actividad conforme al artículo 5 y Anexo III de la Directiva 98/81/CE y Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre:

Las operaciones relacionadas con esta solicitud se clasifican como de Actividad Tipo 3 (actividad de alto riesgo en la que el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente).

III. INFORMACIÓN SOBRE EL ORGANISMO RECEPTOR O PARENTAL DEL CUAL SE DERIVA EL OMG

1) Nombre científico:

Vector de expresión lentiviral: pLenti6/V5-TOPO® (#K4950-10, INVITROGEN); Variante del Human Immunodeficiency Virus (HIV-1)

Taxonomía: *Retroviridae*; género *Lentivirus*.

Nombre común: Lentivirus

2) Descripción de los métodos de aislamiento y de identificación.

a) Técnicas de aislamiento:

En nuestro caso utilizaremos como vector de expresión lentiviral, el pLenti6/V5-D-TOPO® (#K4955-10 INVITROGEN).

Los lentivirus producidos al transfectar los vectores (procedentes de la variante de HIV-1) en células empaquetadoras 293FT, generan partículas víricas, que infectan células de mamífero, incluidas las humanas.

El sistema funciona de la siguiente manera: la información genética de la cepa de lentivirus a utilizar está dividida en tres partes, para dificultar al máximo que el virus se reconstituya espontáneamente fuera de la célula a infectar o incluso dentro de ella. De hecho, son necesarias tres recombinaciones para generar el virus completo, lo que es altamente improbable, y además esta posibilidad nunca ha sido reportada. Los vectores contienen las secuencias de regulación y empaquetamiento del virus por separado, mediando la expresión de las restantes proteínas necesarias para producir partículas víricas infectivas: polimerasa,



integrasa (codificadas por el gen *pol*), proteínas de la cápside (codificadas por el gen *gag*) y proteínas de la envuelta del virus que conferirá el tropismo viral deseado, en este caso humano (codificadas por el gen *env*).

Por tanto, la información genética de la cepa de lentivirus a utilizar es la siguiente:

- 1) Delección en la LTR 3' que inactiva el lentivirus: una vez transducido e integrado en el genoma de la célula diana, el virus pierde la capacidad de producir nuevas partículas infectivas.
- 2) Contiene únicamente tres genes del HIV: *gag*, *pol* y *rev*.
- 3) Emplea la envuelta del VSV-G en lugar de la del HIV.
- 4) Los genes que codifican los componentes estructurales para empaquetar el genoma vírico, están repartidos en 4 plásmidos, que no contienen regiones de homología entre sí, para evitar recombinaciones que generen partículas víricas competentes. (Dull *et al.* 1998)
- 5) Ninguno de los plásmidos integrantes del sistema contiene secuencias empaquetadoras, lo que significa que ninguno de los genes estructurales del HIV está presente en el genoma vírico empaquetado.
- 6) La expresión de *gag* y *pol* es *rev*-dependiente, por la presencia de HIV-1 REE en el transcrito *gag/pol*. (Dull *et al.* 1998).

Se adjunta información del proveedor comercial del sistema de expresión lentiviral ViraPower Lentiviral Direccional TOPO Expresión Kit (Invitrogen) donde se refleja que la producción y transducción viral con este material conlleva un nivel de Bioseguridad (BL2) de acuerdo a las directrices marcadas por el Center for Disease Control (USA) (**Anexo 1**).

Como célula empaquetadora se utilizará la línea celular humana 293FT, derivada de la línea celular Hek293T.

Es importante destacar que los lentivirus producidos por estas células empaquetadoras pueden infectar a células de mamífero; sin embargo, el virus no puede multiplicarse en la célula infectada para generar más virus, puesto que la célula infectada carece de los genes *pol*, *gag* y *env*, que codifican las proteínas necesarias para que el virus se ensamble y sea infectivo.

b) Técnicas de identificación:

Las células empaquetadoras 293FT, que se obtendrán de **Invitrogen** (Nº de catálogo: R700-07), están genéticamente modificadas portando el plásmido pCMVSPORT6TAg.neo, derivado del plásmido pUC.

Asimismo, el plásmido lentiviral pLenti6/V5-D-TOPO se comprará a Invitrogen (nº catálogo **K4950-00**).

Este plásmido se chequeará mediante digestión con enzimas de restricción. Ver mapa en **ANEXO 1**.

c) Marcadores genéticos:

pLenti6/V5-D-TOPO:



CMV Forward: 5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
V5(C-term) Reverse: 5'-ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3'
Primers para secuenciar el plásmido. **Ver secuencia en ANEXO1.**

d) Marcadores fenotípicos:

pLenti6/V5: selección bacteriana con Ampicilina y selección en células de mamífero con Blasticidina.

e) Estabilidad genética:

La estabilidad genética de la célula empaquetadora comercial y del plásmido lentiviral que se va a utilizar es alta.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Todas las necesarias para generar el sistema:

- Generación de un vector lentiviral que contiene las secuencias de regulación y empaquetamiento del virus (*psi*) por separado.
- Transfección en una célula HEK-293FT con vectores de expresión que contienen las restantes proteínas necesarias para producir partículas víricas infectivas: polimerasa, integrasa (codificadas por el gen *pol*), proteínas de la cápside (codificadas por el gen *gag*) y proteínas de la envuelta, que conferirá el tropismo viral deseado, en este caso humano (codificadas por el gen *env*).

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor o parental?

SI NO

En caso afirmativo, especificar para qué clase de los organismos (seres humanos, animales, plantas) se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos extracelulares:

No aplica

5) Si el organismo receptor o parental es patógeno para los seres humanos, especificar el grupo de riesgo asignado de acuerdo con la legislación comunitaria existente, (en particular la Directiva 2000/54/CE) o según otros sistemas de clasificación nacionales o internacionales (OMS, NIH, etc.):

Al no tratarse de un patógeno, debe considerarse perteneciente al Grupo de Riesgo 1; sin embargo, el CNB asigna todos los vectores lentivirales al Grupo de Riesgo 2.

a) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?

No aplica.



b) En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI NO

Porqué: Porque las modificaciones generadas para desarrollar los virus hacen que la regeneración del virus original sea prácticamente imposible.

7) La cepa/línea celular receptora o parental: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?

Si, porque se trata de un preparado comercial previamente purificado, que garantiza la ausencia de agentes contaminantes.

8) Experiencia adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor:

Experiencia general en técnicas de Biología Molecular y Celular. Además en el grupo de investigación solicitante se cuenta con una experiencia de 20 años referida a la manipulación de fragmentos de DNA con capacidad oncogénica.

9) Información sobre la capacidad de supervivencia y de reproducción en el medio ambiente:

a) ¿El organismo receptor es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo?:

Ni el plásmido lentiviral ni las células empaquetadoras son capaces de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo.

Respecto al virus, conviene resaltar que se trata de un virus recombinante defectivo, que no se encuentra en el medio ambiente, y que en el caso de que saliera del laboratorio e infectara un organismo, no sería patógeno por estar altamente atenuado y sin capacidad de replicación.

En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

- | | | |
|-------|----------------------------|--------------------------|
| i) | esporas | <input type="checkbox"/> |
| ii) | endosporas | <input type="checkbox"/> |
| iii) | quistes | <input type="checkbox"/> |
| iv) | esclerocios | <input type="checkbox"/> |
| v) | esporas asexuales (hongos) | <input type="checkbox"/> |
| vi) | esporas sexuales (hongos) | <input type="checkbox"/> |
| vii) | virus | <input type="checkbox"/> |
| viii) | Otros, especifíquese: | |

No aplica



c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

El plásmido lentiviral es un fragmento de ADN sin vida propia. No pueden por tanto sobrevivir en ningún sistema. Las células empaquetadoras tampoco pueden vivir fuera de las condiciones de cultivo del laboratorio.

El virus creado en la célula empaquetadora se inactiva, además de por la radiación ultravioleta, por agentes químicos como detergentes, hipoclorito, etc.

La capacidad de supervivencia del lentivirus en el medio ambiente esta muy limitada, ya que al tratarse de un virus defectivo y no replicativo, no puede propagarse en organismos huésped.

d) Posibles nichos ecológicos:

El plásmido lentiviral es un fragmento de ADN sin vida propia.

Las células empaquetadoras no sobreviven fuera de las condiciones de cultivo.

En caso de escape del laboratorio del lentivirus recombinante defectivo, la cantidad sería mínima, ya que se trabaja a muy baja concentración, por lo que sería muy difícil que el virus se propagara e infectara a ningún organismo. Además, la capacidad de supervivencia del lentivirus en el medio ambiente es muy limitada, pues al tratarse de un virus defectivo es incapaz de propagarse en organismos huésped.

f) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

a) Implicaciones en procesos ambientales (p.e. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo):

Ni el plásmido ni las células empaquetadoras que se van a utilizar se encuentran en el medio ambiente, y es completamente improbable su salida del laboratorio.

Igual razonamiento se aplica a los virus que se generen, ya que no saldrán del laboratorio, y además son defectivos; por tanto, no se esperan efectos en el medio ambiente.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Ni el plásmido ni las células empaquetadoras que se van a utilizar se encuentran en el medio ambiente, y es completamente improbable su salida del laboratorio.

Lo mismo ocurre con los virus que se generan que no saldrán del laboratorio, y además son defectivos; por tanto, no se esperan efectos en el medio ambiente.

11) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor:

No aplica



12) Hábitat natural del organismo:

No aplica

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: DNA de *Homo Sapiens*

Taxonomía: Orden: Primates; Familia: *Hominidae*

Nombre común: Hombre

2) Tipo de material genético utilizado para la transformación:

cDNA (DNA complementario) al genoma de *Homo Sapiens* correspondiente a los siguientes genes:

- Colina quinasa alfa wt (ChoK-alpha)
- Colina quinasa beta wt (Chok-beta)
- RhoA wt
- RhoA QL (mut)
- Rac1 wt
- Rac1 QL (mut)
- Cdc42 wt
- Cdc42 QL (mut)
- Rnd1 wt
- Rnd2 wt
- Rnd3 wt
- Rock1 wt
- Rock1 $\Delta 3$ (mut)
- Rock1 KD (mut)

3) Función prevista del material genético utilizado en la modificación genética:

Nuestros experimentos buscan investigar la función de las proteínas codificadas por estos genes. Estudios previos han demostrado que pueden estar implicadas en la transformación cancerosa o en la proliferación celular.

4) ¿Es patógeno o nocivo de cualquier otra forma (incluidos sus productos extracelulares) el organismo donante, vivo o muerto?

SI NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:



- i) seres humanos
- ii) animales
- iii) plantas

No aplica.

- b) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?:

No aplica

- c) Las secuencias insertadas: ¿están implicadas de alguna forma en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?

No aplica

- 5) ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?

No.

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

- 1) Tipo de modificación genética:

- a) Inserción de material genético
- b) Delección de material genético
- c) Sustitución de bases
- d) Fusión celular
- e) Otros, especifíquese

- 2) Finalidad de la modificación genética:

Generar un lentivirus (que previamente ha sido atenuado *in vivo*) con el fin de transducir los genes en estudio en células de mamífero.

- 3) Método utilizado para llevar a cabo la modificación genética:

Los transgenes se introducirán mediante técnicas de CLONAJE en el vector pLenti6V5 (**Invitrogen # K4950-00**), que contiene la secuencia para iniciar el empaquetamiento, pero que carece de las secuencias que codifican los genes estructurales necesarios para generar virus funcionalmente activos.

A continuación estos vectores lentivirales se transfectarán en las células empaquetadoras HEK 293FT mediante Lipofectamina (Invitrogen). Estas células secretarán al sobrenadante de cultivo las partículas lentivirales conteniendo la secuencia del gen de interés correspondiente, pero que carecen de las secuencias necesarias para ensamblar nuevos viriones (infectivas defectivas). Con este



sobrenadante se llevará a cabo la infección de líneas celulares de mamífero, con el fin de que el transgen en estudio se integre en el genoma de dichas células.

4) ¿Se ha utilizado un vector en el proceso de modificación?

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

Vector Lentiviral pLenti6/V5-D-TOPO (**Invitrogen # K4950-00**)

Para más información:

Ver **ANEXO 1**

b) Dimensiones del vector (pares de bases):

6963 bp

c) Aportar mapa de restricción del vector (funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes en el vector):

Ver **ANEXO 1**.

d) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización: No tiene

ii) Si el vector es un bacteriófago, un cósmido o un fásmid, ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas? No aplica.

iii) ¿Puede transferir el vector marcadores de resistencia a otros organismos?

El vector no se integra en el cromosoma de las células de mamífero que se transfectan, por lo que aunque tiene marcadores de resistencia, estos no se transmiten.

5) Información del inserto:

a) Dimensiones del inserto, mapa de restricción y secuencia:



La secuencia de los cDNA de los genes que se van a introducir se adjunta en el **ANEXO 2**.

b) Origen y función específica de cada parte del inserto:

El origen de los genes es el genoma humano. Los cromosomas correspondientes se adjuntan en el **ANEXO 2**.

Los insertos no están divididos en partes, son una secuencia única que codifica para una proteína humana.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

La **clonación de ADN complementario (cDNA)** incluye los siguientes pasos:

Fragmentación: La preparación de los fragmentos para la clonación se obtiene por PCR, digestión con enzimas de restricción y purificación mediante electroforesis en gel de agarosa o cromatografía con columnas.

Ligación: Consiste en la inserción del fragmento (cDNA) en un vector. Para ello, el vector (que generalmente es circular) se convierte en una secuencia lineal (mediante digestión con enzimas de restricción), y se incuba con el fragmento que contiene el gen de interés en presencia del enzima ADN ligasa.

Transfección: Después de la ligación, el vector con el gen de interés se transfecta en las células empaquetadoras con Lipofectamina™. En el medio de cultivo de estas células empaquetadoras se liberan los viriones. Por tanto, utilizaremos este sobrenadante para infectar posteriormente las células de mamífero en estudio.

d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto:

Indicada en el apartado relativo al organismo receptor.

e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:

Los insertos que se van a clonar en el vector lentiviral [(Colina quinasa alfa wt (ChoK-alpha), Colina quinasa beta wt (Chok-beta), RhoA wt, RhoA QL (mut), Rac1 wt, Rac1 QL (mut), Cdc42 wt, Cdc42 QL (mut), Rnd1 wt, Rnd2 wt, Rnd3 wt, Rock1 wt, Rock1 Δ3 (mut), Rock1 KD (mut)] son secuencias de cDNA que codificarán las proteínas correspondientes, y ninguno de ellos incluye elementos reguladores.

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Sí, las secuencias de los insertos se adjuntan en el **ANEXO 2**.

g) ¿Contiene secuencias que no son necesarias para la función deseada? En caso afirmativo, especifíquese.

No.



h) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese.

No.

VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre?

En un principio si. Los cDNA que codifican los genes humanos de interés se clonarán en un vector lentiviral (pLenti6/V5-D-TOPO®).

Una vez transfectado este vector en las células empaquetadoras, se formarán los viriones (el material genético forma parte de una partícula vírica), que infectarán una sola vez, ya que carecen de los otros genes necesarios para su replicación (gag, pol y env).

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

El número de copias de cada uno de los genes en el vector lentiviral es 1.

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

Si.

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?

No

En caso afirmativo:

i) número de copias: No aplica.

ii) localización cromosómica: No aplica.

iii) secuencias laterales: No aplica

iv) ¿La inserción inactiva la expresión de otros genes?: No aplica

c) Si se trata de un virus:

- i) Es defectivo
- ii) Es potencialmente inducible



Análisis moleculares realizados relativos a la expresión del producto deseado (PCR, Northern, secuenciación, otros):

- i) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)
- ii) Transcripcionales (síntesis de niveles de mRNA)
- iii) Traduccionales (síntesis de niveles de proteínas)

La expresión de los genes de interés se puede determinar en las células diana mediante Western Blotting (WB) y Polymerase Chain Reaction (PCR).

Aportar toda la documentación al respecto.

Ver secuencias de los genes en **ANEXO 2**.

2) Características genéticas y fenotípicas modificadas del organismo receptor o parental como resultado de la manipulación genética:

a) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo? En caso afirmativo, especifíquese:

No. El virus generado es un virus defectivo, que crece en las mismas condiciones de cultivo que el virus defectivo parental. Además, ninguno puede crecer fuera de estas condiciones de cultivo.

b) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción? En caso afirmativo, especifíquese:

No. La información genética de la cepa de lentivirus a utilizar sigue dividida en tres partes en la célula empaquetadora, a fin de impedir que el virus se reconstituya de manera espontánea, siendo necesarias tres recombinaciones para regenerar el virus completo (lo que es altamente improbable y no se ha observado previamente).

c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese:

No, ya que ninguno de los dos se encuentra en el medio ambiente.

d) ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? En caso afirmativo, especifíquese:

No

e) Marcadores específicos del OMG:

El OMG será un virus que contendrá en su material genético alguno de los siguientes genes:



- Colina quinasa alfa wt (ChoK-alpha)
- Colina quinasa beta wt (Chok-beta)
- RhoA wt
- RhoA QL (mut)
- Rac1 wt
- Rac1 QL (mut)
- Cdc42 wt
- Cdc42 QL (mut)
- Rnd1 wt
- Rnd2 wt
- Rnd3 wt
- Rock1 wt
- Rock1 $\Delta 3$ (mut)
- Rock1 KD (mut)

Sin embargo no poseerá en su genoma los genes *gag*, *pol* y *env* necesarios para su ensamblaje.

Además el virus defectivo llevará un gen de resistencia a blasticidina.

- 3) Estabilidad genética del OMG (Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones)

El plásmido utilizado y las células empaquetadoras tienen una alta estabilidad genética. Los virus que se generan en la célula empaquetadora, infectarán la célula en estudio una única vez y no se replicarán; por tanto no se producirán nuevas generaciones de este OMG. Estos virus se generaron siempre de igual manera, (transfectando un plásmido de absoluta estabilidad), y que además son incapaces de replicarse.

- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos:

El virus resultante infectará las células de mamífero, integrándose la secuencia del gen (inserto) correspondiente entre las regiones LTR de su genoma. De hecho, es la finalidad de esta técnica, que el gen de interés se inserte en el material genético de la célula infectada de manera estable para que se exprese la proteína correspondiente).



Sin embargo, las células de mamífero son incapaces de generar virus porque éste no es replicativo. El efecto será la sobre-expresión de las proteínas codificadas por el gen en estudio. Es una técnica ampliamente utilizada para obtener la expresión estable de proteínas en células de mamífero. La única posibilidad de transferencia al operador sería la inoculación accidental.

- 5) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar.



No. Tanto en el sistema parental como en el modificado por nosotros, la información genética de la cepa de lentivirus a utilizar está dividida en tres partes a fin de evitar que el virus se reconstituya de manera espontánea, siendo necesarias tres recombinaciones para regenerar el virus completo, lo que es altamente improbable y no se ha observado con anterioridad. Solo existe posibilidad de transferencia al operador mediante la inoculación accidental.

6) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados.

a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG.

El OMG se identificará al final del proceso. Se infectarán las células de mamífero con el sobrenadante de la célula empaquetadora que contiene los viriones, y en estas células se comprobará si se ha insertado el gen de interés, mediante dos técnicas principales:

- RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), empleando oligonucleótidos que flanquean la secuencia de los genes introducidos, para identificar al gen introducido.
- WB (Western Blotting): utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas codificadas por los genes introducidos en el vector [(Colina quinasa alfa wt (ChoK-alpha), Colina quinasa beta wt (Chok-beta), RhoA wt, RhoA QL (mut), Rac1 wt, Rac1 QL (mut), Cdc42 wt, Cdc42 QL (mut), Rnd1 wt, Rnd2 wt, Rnd3 wt, Rock1 wt, Rock1 Δ 3 (mut) y Rock1 KD (mut)].

b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente.

El OMG no puede sobrevivir en el medio ambiente, por tanto no son necesarias

VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1) Naturaleza de las operaciones:

- | | | |
|------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| a) Enseñanza | <input type="checkbox"/> | Volumen máximo: |
| b) Investigación | <input checked="" type="checkbox"/> | Volumen máximo: 50ml por ensayo |
| c) Desarrollo | <input type="checkbox"/> | Volumen máximo: |

2) Periodo propuesto para la utilización confinada:

Se prevé un periodo de tres años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada.

3) Finalidad de la utilización confinada, incluidos los resultados esperados:



Construcción segura de un vector de expresión lentiviral defectivo, variante del Human Immunodeficiency Virus (HIV-1), que infecta células humanas, para transfectar oncogenes en líneas celulares humanas y estudiar su efecto.

- 4) Descripción de los métodos de manejo de los OMG (incluyendo descripción de las fases de cultivo y concentración máxima de OMG en el cultivo):

El transgén se introducirá mediante técnicas de CLONAJE entre las secuencias LTR virales del vector pLenti6V5-TOPO (Invitrogen), que no contiene genes estructurales virales funcionalmente activos.

1. Producción de sobrenadante en las células empaquetadoras de lentivirus 293FT: los plásmidos integrantes del sistema se transfectarán empleando Lipofectamina (Invitrogen) en células 293 FT. Dichas células, tras integrar los plásmidos, producirán al medio de cultivo las partículas lentivirales. Los sobrenadantes recogidos a las 24, 48 y 72 horas de cultivo contienen alta carga viral y deben manipularse con la máxima precaución.
2. Sobre la población diana (placas de 6 pocillos con 10^5 células por pocillo, entre 6 y 10 pocillos por experimento), se añade un volumen de 2 ml por pocillo de sobrenadante infectivo proveniente de las células empaquetadoras 293FT (título entre 10^6 - 10^8 CFU) y se mantiene en contacto 48 horas (aproximadamente).
3. En el genoma de la línea celular humana se integra el transgen de interés. Las células transfectadas se pueden seleccionar gracias a que el plasmido pLenti6V5 lleva genes de resistencia a blasticidina. Las células genéticamente modificadas se mantendrán en cultivo un periodo de tiempo variable en función de la finalidad del experimento: ensayos en infecciones transitorias o establecimiento de líneas celulares permanentemente modificadas.
4. Todas las manipulaciones previas a la obtención del lisado de las células modificadas se realizarán en el laboratorio del P3. El material proteico y genómico extraído para posteriores estudios ya no presenta ningún tipo de riesgo biológico, y por tanto, los restos celulares y de sobrenadante se inactivarán y se desecharán según la normativa del laboratorio P2.

Para la extracción de este material proteico y genómico, la línea celular humana se lisa mediante ruptura de membranas, con lo cual el virus que es un virus encapsulado queda totalmente inactivo.

El tampón de lisis para la extracción de proteínas contiene 50mM Tris-HCl pH 7.5 y 0.5% Tritón-X100.

El tampón de lisis para la extracción de ácidos nucleicos es el reactivo Tripure (Roche # 11 667 165 001)

Durante el proceso infectivo se infectarán un máximo de 2 placas de 6 pocillos con 2ml de sobrenadante por pocillo.

Se estima que en las células se obtendrán un título viral de 10^6 - 10^7 ufc.

El transgen en estudio se integrará en el genoma de dichas células de mamífero. Estas células de mamífero ya no son capaces de generar nuevas partículas virales.

Las líneas celulares que utilizaremos son:

Líneas celulares tumorales humanas:



Mama: MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-435, SK-Br3, T47D, MCF-7
Pulmón: H1299, H460, H82, H510
Cólon: HT-29, DLD-1, HCT116, SW620, SW480, WiDr, LoVo, RKO, Colo201 SW480
Vejiga: TccSup, HT-1376, J82, SW780 / Cervix: HeLa / Epidermis: A431 / Páncreas:
Mia-Paca-2
Linfoide: Jurkat, P3HR-1, JLN3, EJM
Próstata: C3 / Hígado: HepG2, Hep3B2 / Ovario: SK-OV-3, OV-Car-3
Hueso: SAOS-2 / Riñón: 769-P / Melanoma: Sk-MEL-1, Hs-895T

Lineas celulares normales

Hek293T (riñón), HMEC y MCF10A (mama), Hek 293FT (células empaquetadoras del lentivirus), FHC (cólon)

- 5) Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse incluida la información relativa a la gestión de los residuos (tratamiento, forma y destino final):

Todos los residuos biológicos que se generen serán inmediatamente inactivados dentro de los recintos de contención (cabinas de bioseguridad) mediante la utilización de germicidas de amplio espectro usados en rotación. Posteriormente, los residuos líquidos ya inactivados se enviarán a la planta de tratamiento de efluentes líquidos del laboratorio y los sólidos se autoclavarán. Los procedimientos de autoclavado y esterilización por calor en la planta "Biowaste" se han validado previamente y se validarán periódicamente mediante la utilización de kits de esporas del microorganismo testigo *Bacillus stearothermophilus*. Estas validaciones se han realizado a nivel interno (servicio de bioseguridad del CNB) y a nivel externo (empresas especializadas en validaciones de estos sistemas). Para mayor información remitirse a la solicitud de autorización de la instalación.

- 5) Resultados previstos:

Se prevé obtener un lentivirus modificado, capaz de infectar células de mamíferos, pero defectivo, lo que implica que el virus no tiene capacidad infectiva.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

- 1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al Centro Nacional de Biotecnología es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

-El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos. Es más, consideramos que el nivel de contención obtenido excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.

-Estos medios e infraestructura ya se han validado previamente por una empresa externa y serán validados por ésta empresa u otras anualmente o tras averías.



Igualmente, el servicio de Seguridad Biológica validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.

-La instalación dispone de un completo reglamento de funcionamiento donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, tanto para el personal usuario como para el propio servicio de seguridad biológica. Con ello se pretende realizar una gestión integral en Bioseguridad. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMG, limpieza y sanitización de zona, esterilización e inactivación biológica se encuentran protocolizados por escrito y se dispone de programas de actuación para aquellos procedimientos en que sea conveniente.

-La instalación dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.

-Tanto el laboratorio, como las instalaciones que aseguran las necesarias medidas de contención secundaria, disponen de variados medios de alarma "in situ" y en la consola de control central del edificio ante la ruptura accidental de las barreras de contención secundaria.

-El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es muy bajo al tratarse de servicios de apoyo a la investigación o de laboratorios de técnicas especiales de uso común. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.

-El Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se encuentra enclavado en una zona relativamente nueva del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta zona se caracteriza por la amplitud existente entre los edificios que la constituyen, fundamentalmente otros centros de investigación.

-No existen zonas residenciales cercanas al CNB.

-No existen en las cercanías cultivos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos, fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.

3) Notificación de la instalación: indicar las secciones donde se desarrolla la actividad objeto de la notificación, con indicaciones de la categoría de confinamiento prevista:

Las operaciones indicadas se realizarán en uno de los tres sub-laboratorios del laboratorio de cultivos "in vitro" de nivel 3 de contención biológica con autorización del 7/03/01; número de notificación: A/ES/00/I-8



IX. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Las normas a seguir serán las expuestas en el reglamento de funcionamiento del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica incluido en la solicitud de autorización.

2) Formación del personal adscrito:

El personal adscrito ha recibido la formación e información indicada en “Descripción de la información suministrada a los trabajadores”, apartado que se adjuntó a la documentación para la solicitud de autorización del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica.

Todo el personal implicado tiene experiencia en la manipulación de los agentes biológicos que se indican en esta solicitud y su formación académica es licenciatura o doctorado.

3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Viene descrito en el apartado 6.F del reglamento de funcionamiento de la instalación que se incluyó en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

Vienen descritos en los apartados 6.B, 6.C, 6.D y 6.G. del Reglamento de funcionamiento de la instalación que se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio

5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Vienen descritos en el apartado 6.D. del Reglamento de funcionamiento de la instalación y más específicamente en “Procedimientos y planes de comprobación de la eficacia permanente de las medidas de confinamiento”.

Esta información se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio

Además el servicio de seguridad biológica velará por el cumplimiento de las normas de control de acceso, manipulación, descontaminación, esterilización, sanitización, etc. según se indica en diferentes apartados del citado Reglamento.

6) Gestión de residuos (describir el sistema utilizado para cada tipo de residuo y quien lo lleva a cabo):



Todo lo concerniente a la gestión de los residuos generados se especifica en los apartados 4.F y 6.H del Reglamento de funcionamiento de la instalación que se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

7) Inactivación de residuos (método, forma final, destino):

Todo lo concerniente a la gestión de los residuos generados se especifica en los apartados 4.F y 6.H del Reglamento de funcionamiento de la instalación que se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES (Cumplimentar para los tipos 2, 3 y 4)

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Vienen indicadas en el Plan de emergencias y evacuación incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Viene indicado en el Plan de emergencias y evacuación incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

- Documentación:
 - Manual de Protección Radiológica, Seguridad Biológica y Química del CNB.
 - Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB.
 - Procedimientos Normalizados de Trabajo del Servicio de Seguridad Biológica del CNB.
- Cursos y seminarios:
 - Seminarios generales sobre normas de seguridad frente a agentes biológicos, químicos y radiactivos impartido por el Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica del CNB.
 - Seminarios específicos sobre el Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB.

4) Planes de emergencia:

El Plan de emergencias y evacuación del laboratorio se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.



**EVALUACIÓN DE RIESGO DE OPERACIONES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE (Ver NOTA (1))**

Nº de Registro:	Nº de Notificación:
-----------------	---------------------

A. Notificador

1. Nombre del Centro, Institución o Empresa:

Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

2. Domicilio del notificador:

**Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).
Campus Universidad Autónoma. Cantoblanco.
28049-Madrid**

3. Responsable de la actividad de utilización confinada:

Dr. Juan Carlos Lacal Sanjuan
Profesor de Investigación (CSIC)

Firma del notificador:

Persona de contacto:

Fernando Usera Mena, responsable del Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica del CNB

Tel: 915854541

Fax: 915854506

Correo electrónico: fusera@cnb.uam.es



B. Descripción de la actividad.

1. Objetivo de la actividad:

Construcción segura de un virus recombinante defectivo basado en el Lentivirus, que infecta células humanas, con objeto de utilizarlo para la transfección de oncogenes en líneas celulares humanas y estudiar su efecto.

2. Duración de la actividad:

Se prevé un periodo de tres años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada.



C. Evaluación de riesgo (Ver NOTA (2))

1. Identificación de las propiedades nocivas del OMG, en función de las características del:
(Ver NOTA (3))

1.1. Organismo receptor.

El organismo receptor no existe en la naturaleza. Es un sistema utilizado en miles de laboratorios del mundo, para expresar de manera artificial proteínas en células de mamífero.

Sistema lentiviral ViraPower-pLenti6V5 (Invitrogen).

virapower_lentiviral_system_man.pdf

<http://products.invitrogen.com/ivgn/en/US/adirect/invitrogen?cmd=catProductDetail&productID=K531000>

El sistema funciona de la siguiente manera:

La información genética de la cepa de un lentivirus está transfectada en el interior de unas células, llamadas **células empaquetadoras**, pero dividida en tres partes a fin de dificultar al máximo que el virus se reconstituya de manera espontánea, siendo necesarias tres recombinaciones para generar el virus completo lo que es altamente improbable y no se ha observado con anterioridad. Estas células empaquetadoras expresan las proteínas necesarias para producir partículas víricas infectivas: polimerasa, integrasa (codificadas por el gen pol), proteínas de la cápside (codificadas por el gen gag) y proteínas de la envuelta del virus que conferirá el tropismo viral deseado, en este caso humano (codificadas por el gen env),

Las células empaquetadoras se adquirirán de Invitrogen (293FT Cell Line; nº cat. R70007, INVITROGEN) (<http://www.invitrogen.com>)

Además se necesita un vector, también llamado plásmido lentiviral, que va a proporcionar las secuencias de regulación y empaquetamiento del virus, y en el que se subclonará entre las secuencias LTR (long terminal repeat) el gen que deseamos sobreexpresar en las células en estudio (vector pLenti6/V5-D-TOPO, INVITROGEN).

Como célula empaquetadora se utilizará una estirpe celular derivada de la humana Hek293T. Cuando el plásmido lentiviral se transfecte en las células empaquetadoras, estas secretarán virus al medio de cultivo que serán capaces de infectar a células de mamífero, en el genoma de las cuales se integrará entre las secuencias LTR, y por tanto no será infectivo. Una vez que ha infectado a la célula, el virus no puede multiplicarse y la célula no puede generar más virus, ya que esta célula infectada carece de los genes pol, gag y env que son necesarios para que el virus sea ensamblado e infectivo.

- Naturaleza de la patogenicidad, virulencia, infecciosidad, alergenicidad, toxicidad y vectores de transmisión de enfermedades:

Se trata de un vector viral defectivo no replicativo. La información genética de la cepa de un lentivirus está dividida en tres partes a fin de dificultar al máximo que el virus se reconstituya de manera espontánea, siendo necesarias tres



recombinaciones para generar el virus completo lo que es altamente improbable y no se ha observado con anterioridad.

- Naturaleza de los vectores autóctonos y los agentes adventicios en los casos en que puedan movilizar el material genético insertado, y frecuencia de movilización:

No aplica

- Naturaleza y estabilidad de las mutaciones inactivadoras, si se producen:

La información genética de la cepa de un lentivirus está transfectada en el interior de unas **células empaquetadoras**, pero dividida en tres partes a fin de dificultar al máximo que el virus se reconstituya de manera espontánea, siendo necesarias tres recombinaciones para generar el virus completo lo que es altamente improbable y no se ha observado con anterioridad.

- Toda modificación genética previa:

Todas aquellas necesarias para crear el sistema:

- Generación de un vector lentiviral que contiene las secuencias de regulación del virus
- Transfección de una célula 293FT con vectores de expresión que contienen las restantes proteínas necesarias para producir partículas víricas infectivas: polimerasa, integrasa (codificadas por el gen pol), proteínas de la cápside (codificadas por el gen gag) y proteínas de la envuelta (codificadas por el gen env).

- Gama de hospedadores (si procede):

Cualquier célula de mamífero puede ser infectada, pero una sola vez. El virus no es replicativo. Esto es así, porque el virus introduce únicamente el ADN contenido entre las secuencias LTR, el material genético de estos virus no contiene el resto de genes necesarios para producir nuevas partículas víricas infectivas: polimerasa, integrasa (codificadas por el gen pol), proteínas de la cápside (codificadas por el gen gag) y proteínas de la envuelta (codificadas por el gen env).

- Todo rasgo fisiológico significativo que pueda alterarse en el MMG final y, si procede, su estabilidad:

El OMG se considera estable.

- Hábitat natural y distribución geográfica:

Estos virus lentivirales no existen en la naturaleza y no son capaces de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo en el laboratorio.

- Participación significativa en procesos ambientales (Fijación del nitrógeno, regulación del pH., etc):

Estos virus lentivirales no existen en la naturaleza y no son capaces de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo en el laboratorio.



- Interacción con otros organismos del entorno y efectos sobre éstos (incluyendo las probables propiedades competitivas, patogénicas o simbióticas):

No aplica

- Capacidad de formar estructuras de supervivencia (como esporas o esclerocios):

No aplica

1.2. Organismo donante: Homo sapiens sapiens

El material genético que se va a introducir en el plásmido lentiviral es ADN copia de genes humanos obtenido de células humanas.

- Naturaleza de la patogenicidad, virulencia, infecciosidad, toxicidad y vectores de transmisión de enfermedades:

No aplica

- Naturaleza de los vectores autóctonos:

✓ Secuencia: No aplica

✓ Frecuencia de movilización y especificidad: No aplica

✓ Presencia de genes que confieren resistencia a las sustancias antimicrobianas, incluidos los antibióticos: El vector lentiviral lleva como marcador el gen de la resistencia a Blastidina, que sí pasará junto con el gen de interés a las células infectadas.

- Gama de hospedadores: No aplica.

- Otros rasgos fisiológicos pertinentes: No aplica

1.3. Inserto.

- Identidad y función específicas del inserto (genes):

cDNA (DNA complementario) al genoma de Homo Sapiens correspondiente a los siguientes genes:

- Colina quinasa alfa wt (ChoK-alpha)
- Colina quinasa beta wt (Chok-beta)
- RhoA wt
- RhoA QL (mut)
- Rac1 wt
- Rac1 QL (mut)
- Cdc42 wt
- Cdc42 QL (mut)



- Rnd1 wt
 - Rnd2 wt
 - Rnd3 wt
 - Rock1 wt
 - Rock1 $\Delta 3$ (mut)
 - Rock1 KD (mut)
- Nivel de expresión del material genético insertado:
No aplica
 - Fuente del material genético e identidad del organismo u organismos donantes y características, si procede:
El organismo donante es Homo Sapiens Sapiens.
 - Historia de las modificaciones genéticas previas, si procede:
No se han descrito modificaciones genéticas previas.
 - Situación del material genético insertado (posibilidad de activación o desactivación de los genes del hospedador debido a la inserción):
El genoma del virus defectivo, que contiene nuestro gen de interés se integrará al azar en el genoma de las células diana de una manera estable (esta es la finalidad de la técnica), y consecuentemente expresará la proteína de interés.
En caso de accidente e inoculación del virus en el investigador, el gen se introduciría en el genoma (si se diesen condiciones idóneas), pero en ningún caso el lentivirus sería capaz de replicarse.

1.4. Vector.

- Naturaleza y fuente del vector:

Vector de expresión lentiviral: pLenti6/V5-TOPO® (#K4950-00, INVITROGEN)
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/plenti6v5dtopo_man.pdf

- Estructura y cantidad de todo ácido nucleico del vector y/o donante que quede en la construcción final del microorganismo modificado.

El retrovirus llevará una copia de la siguiente construcción. No lleva los genes gag, pol y env y por ello es defectivo.



- Si está presente en el MMG final, frecuencia de movilización del vector insertado y/o capacidad de transferencia de material genético.

El vector no está presente en el virus final defectivo. Únicamente la secuencia que se encuentra entre las dos secuencias LTR formarán parte del genoma viral.



1.5. Organismo modificado genéticamente resultante.

1.5.1. Efectos para la salud humana.

- Efectos tóxicos o alergénicos previstos del MMG y/o sus productos metabólicos.

Aunque se trata de un virus que no se puede replicar, existe un riesgo: que los viriones entraran en contacto con células del investigador como producto de una inoculación accidental, y pudieran producir una expresión elevada de los oncogenes en estudio. Sin embargo, los lentivirus utilizados no son replicativos.

- Comparación de la patogenicidad del microorganismo modificado con la del receptor o (en su caso) del organismo parental.

En ambos sistemas la información genética de la cepa de lentivirus está dividida en tres partes a fin de dificultar al máximo que el virus se reconstituya de manera espontánea, siendo necesarias tres recombinaciones para regenerar el virus completo lo que es altamente improbable y no se ha observado con anterioridad.

El OMG tiene el único riesgo de posible inoculación en células del investigador por pinchazo accidental y por tanto posible expresión elevada del oncogen en estudio en una sola célula del investigador. (El virus no infectará ninguna célula más, ya que es defectivo).

- Capacidad de colonización prevista.

Ninguna. El OMG generado es un virus que no puede crecer fuera de las condiciones de cultivo en células empaquetadoras.

- Si el microorganismo es patógeno para personas inmunocompetentes:

No es patógeno.

- Enfermedades causadas y mecanismos de transmisión, incluidas la capacidad de invasión y la virulencia. No aplica.

✓ Dosis infecciosa:
No aplica

✓ Posible alteración de la ruta de infección o de la especificidad tisular:
No aplica.

✓ Posibilidad de supervivencia fuera del hospedador humano:



El virus solo puede replicar dentro de las células empaquetadoras.

- ✓ Estabilidad biológica:
No se conoce, pero se prevé que la estabilidad genética sea muy alta.

- Pautas de resistencia a los antibióticos: Si en caso de accidente, el investigador se inocula el virus, las células infectadas serán resistentes a blastocidina.

- Alergenicidad: No se esperan reacciones alérgicas en caso de inoculación accidental.

- Toxigenicidad: No se esperan reacciones toxicológicas en caso de inoculación accidental.

- Disponibilidad de terapias apropiadas y de medidas profilácticas: En caso de infección accidental por el virus se procedería a un seguimiento y terapia adecuados a los resultados clínicos que se pudieran obtener.

1.5.2. Efectos para el medio ambiente.

- Ecosistemas a los que el microorganismo podría pasar accidentalmente a partir de la utilización confinada:
El OMG es incapaz de sobrevivir en el medio ambiente

- Supervivencia, multiplicación y grado de diseminación previstos para el microorganismo modificado en los ecosistemas correspondientes:
No aplica

- Resultados previstos para la interacción entre el microorganismo modificado y los organismos o microorganismos que pudieran verse expuestos en caso de liberación accidental al entorno:
No aplica

- Efectos conocidos o previstos sobre plantas y animales como, por ejemplo, patogenicidad, toxicidad, alergenidad, vector de patógenos, pautas alteradas de resistencia a los antibióticos, alteraciones de tropismos o especificidad de hospedador, y colonización:
No aplica.

- Implicaciones conocidas o previstas en procesos biogeoquímicos:
No aplica

2. Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

- | | |
|--------|-------------------------------------|
| Tipo 1 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 2 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 3 | <input checked="" type="checkbox"/> |



Tipo 4

3. Probabilidad de que se produzcan efectos nocivos y gravedad de los mismos, en función de:

- 3.1. Características de la actividad (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental).

La actividad se va a llevar a cabo en el laboratorio de contención de nivel 3, por lo que el organismo modificado estará confinado a este espacio y no saldrá en ningún momento del mismo. El riesgo de inoculación accidental del vector lentiviral es prácticamente nulo debido a la ausencia de material punzante y cortante en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica y por contacto no hay riesgo de contagio.

- 3.2. Concentración y escala utilizadas.

Para producir el virus defectivo se utilizarán células empaquetadoras 293FT en un volumen máximo de 50 ml de sobrenadante.

- 3.3. Condiciones de cultivo (se tendrá en cuenta el entorno potencialmente expuesto, la presencia de especies susceptibles, supervivencia del OMG y efectos sobre el entorno físico).

El rescate de virus defectivos producidos se realizará en células Phoenix. Los experimentos se realizarán en el laboratorio de contención biológica de nivel 3, por lo que el personal y el entorno expuestos se reducen al máximo.

4. Determinación de la clasificación y medidas de confinamiento definitivas y confirmación de su idoneidad:

Actividad confinada de Tipo 3. Actividad en la cual el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.

5. Determinación del riesgo en el caso de que se produzca una liberación accidental: (Ver NOTA (6))

- 5.1. Información adicional relativa a la ubicación de la instalación (proximidad a fuentes de peligro potenciales, condiciones climáticas predominantes, etc.)

- 1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al Centro Nacional de Biotecnología es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

-El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos. Es más, consideramos que el nivel de



contención obtenido excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.

-Estos medios e infraestructura ya se han validado previamente por una empresa externa y serán validados por ésta empresa u otras anualmente o tras averías. Igualmente, el servicio de Seguridad Biológica validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.

-La instalación dispone de un completo reglamento de funcionamiento donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, tanto para el personal usuario como para el propio servicio de seguridad biológica. Con ello se pretende realizar una gestión integral en Bioseguridad. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMG, limpieza y sanitización de zona, esterilización e inactivación biológica se encuentran protocolizados por escrito y se dispone de programas de actuación para aquellos procedimientos en que sea conveniente.

-La instalación dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.

-Tanto el laboratorio, como las instalaciones que aseguran las necesarias medidas de contención secundaria, disponen de variados medios de alarma "in situ" y en la consola de control central del edificio ante la ruptura accidental de las barreras de contención secundaria.

-El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es muy bajo al tratarse de servicios de apoyo a la investigación o de laboratorios de técnicas especiales de uso común. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.

-El Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se encuentra enclavado en una zona relativamente nueva del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta zona se caracteriza por la amplitud existente entre los edificios que la constituyen, fundamentalmente otros centros de investigación.

-No existen zonas residenciales cercanas al CNB.

-No existen en las cercanías cultivos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos, fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.

3) Notificación de la instalación: indicar las secciones donde se desarrolla la actividad objeto de la notificación, con indicaciones de la categoría de confinamiento prevista:



Las operaciones indicadas se realizarán en uno de los tres sub-laboratorios del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica con autorización del 7/03/01; número de notificación: A/ES/00/I-8

5.2. Condiciones en las que podría producirse un accidente.

Vienen indicadas en el Plan de emergencias y evacuación incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

5.3. Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales.

Viene indicado en el Plan de emergencias y evacuación incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

5.4. Planes de emergencia.

El Plan de emergencias y evacuación del laboratorio se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio



NOTAS al Modelo de Evaluación de riesgo de operaciones de utilización confinada de organismos modificados genéticamente

- (1) Para la elaboración de la evaluación de riesgo de la actividad propuesta se tendrá en cuenta toda la información suministrada, en su caso, en el formulario relativo a la Notificación de Operaciones con organismo modificados genéticamente (Parte A), así como el relativo a la Notificación de Instalaciones donde se realizan operaciones con organismos modificados genéticamente (Parte B).
- (2) Para llevar a cabo dicha evaluación se tendrá en cuenta el procedimiento establecido en el Anexo III de la Directiva 98/81/CE, de 26 de octubre de 1998 y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo descrita en el Anexo III de la Directiva 98/81/CE.
- (3) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.
- (4) Para establecer esta primera valoración se tendrá en cuenta lo dispuesto en el artículo 5.3 de la Directiva 98/81/CE y, en caso de ser aplicable, otros sistemas de clasificación nacionales e internacionales existentes (Por ejemplo, la Directiva 2000/54/CE sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo).
- (5) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.
- (6) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.

ANEXO 1

**NOTIFICACIÓN SOBRE OPERACIONES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE**

Nº de Registro: 	Nº de Notificación:
--	--

pLenti6/V5-D-TOPO®

INVITROGEN

Cat. No.

K495000

K495510

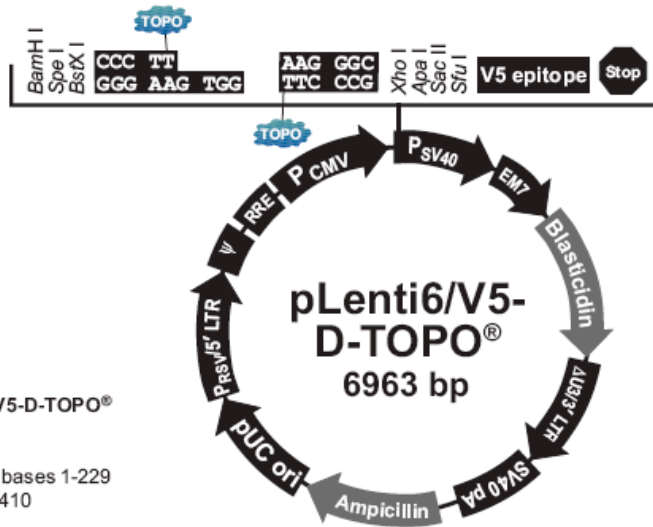
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Global/invitrogen-search-results.html?searchMode=simpleall&searchTypes=meta.collection%3Avector&searchTerm=pLenti6%2FV5-D-TOPO%2AE&x=0&y=0&filter=vectors>

SEQUENCE

AATGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAA
GGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCCTTATTAGGAAGGC
AACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAAATGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTG
CCTAGCTCGATACATAAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTA
GGGAACCCACTGCTTAAAGCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGTCTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTGTG
GTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGAAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCG
AACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGTGAAGCGC
GCACGGCAAGAGCGAGGGCGGCGACTGGTGTAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGA
GAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTA
AGGCCAGGGGGAAAAGAAAAATATAAATTTAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCG
CAGTTAATCTCGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACGGGACAGCTACAACCATCCCT
TCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCCTCTATTGTGTGCATCAAAGG
ATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCG
CACAGCAAGCGCCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTTGGAGAAGTGAATTAT
ATAAATATAAAGTAGTAAAAATTAACCAATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAGAGAAGAGTGGTGC
GAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATG
GGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACA
ATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCA
GGCAAGAATCTTGCTGTGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTTGGGA
AAACTCATTGCAACCATGCTGTGCCCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACGATTTGGGA
ATCACACGACCTGGAGTGGGACAGGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGA
AGAATCGCAAAAACAGCAAGAAAAGAAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGG
AATTGGTTTAAACATAACAAAATTGGCTGTGGTATATAAATTTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAG
GTTTAAAGAAATAGTTTTTGTCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTACCATTATCGTT
TCAGACCCACCTCCAACCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGA
GACAGAGACAGATCCATTGATTAAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGATAAGCTTTGGGAGTTCCGCGTTA
CATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGAC
GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACT
GCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT
GGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT
AGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCA
CGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAAATCAACGGGACT
TTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCAATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTA
TATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTTACCTCCAT
AGAAGACACCGACTCTAGAGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTGATCCCTTACCAAGGGCTCGAG
TCTAGAGGGCCCGGGTTCGAAAGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACC
GGTTAGTAATGAGTTTGGAAATTAATCTGTGGAATGTGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTC
CCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGC
TCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTC
CGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTAT
TTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGC
CTAGGCTTTTGCAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGTTGACAA
TTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAAATACGCAAGGTGAGGAACAAACCATGGCCAAAGCA
TTGTCTCAAGAAGAATCCACCCCTATTGAAAGAGCAACGGCTACAATCAACAGCATCCCCACTCTCAAG
ACTACAGCTCGCCAGCGAGCTCTCTTAGCCGACGGCGCATCTTCACTGGTGTCAATGTATATCATTT
TACTGGGGACCTTGTGCAGAACTCGTGGTGTGGGCACTGCTGCTGCTGCGGCAGCTGGCAACCTGACT
TGTATCGTTCGCGATCGGAAATGAGAACAGGGGCATCTTGAGCCCTGCGGACGGTGGCGACAGGTGCTTC

TCGATCTGCATCCTGGGATCAAAGCCATAGTGAAGGACAGTGATGGACAGCCGACGGCAGTTGGGATTCG
TGAATTGCTGCCCTCTGGTTATGTGTGGGAGGGCTAAGCACAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAAT
GACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCAC
TCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGG
AGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCCTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCCTCAAGTAGT
GTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATC
TCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTATTATTTCAGTATTTATAAAGCTTGCCTAAGAAAATGAATATCAGAGA
GTGAGAGGAACCTGTTTATGTCAGCTTATAAATGGTTACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAAATTTACAAA
TAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGG
CTCTAGCTATCCCGCCCCTAACTCCGCCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCC
CCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAAG
TAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGGACGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGCG
CTCACTGGCCGTCGTTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCA
GCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCCTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGC
GCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGCGGTGTGGTGGTTACGCG
CAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCC
ACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTAC
GGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTATGGTTTACGTTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGT
TTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTC
AACCTATCTCGGCTATTTCTTTTGTATTTATAAGGGATTTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATG
AGCTGATTTAAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTT
CGGGGAAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTTCAAATATGTATCCGCTCATGA
GACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTTCAACATTTCCGTGT
CGCCCTTATTTCCCTTTTTTTCGGCATTTTGCCTTCCGTTTTTTTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTA
AAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCC
TTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGT
ATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTTCGCCGCATACACTATTTCTCAGAATGACTTGGTT
GAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATATGTCAGTGTGCCA
TAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTTCGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGC
TTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATA
CCAAACGACGACGCTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCG
AACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACT
TCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAAGCTGGGTCTCGC
GGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTC
AGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTACTGATTAAGCATTTGGTAACT
GTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAG
GTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAG
ACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC
AAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA
ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCA
AGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGA
TAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACG
GGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACCTGAGATACCTACAGCGTGAGC
TATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGCTCGGAAC
AGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAACGCTGGTATCTTTATAGTCCGTGTCGGGTTTTCGCCAC
CTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACG
CGGCCTTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGA
TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGTAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGC
AGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGA
TTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGT
GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATT
GTGAGCGGATAACAATTTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCCCTC
ACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTGCAAGCTT

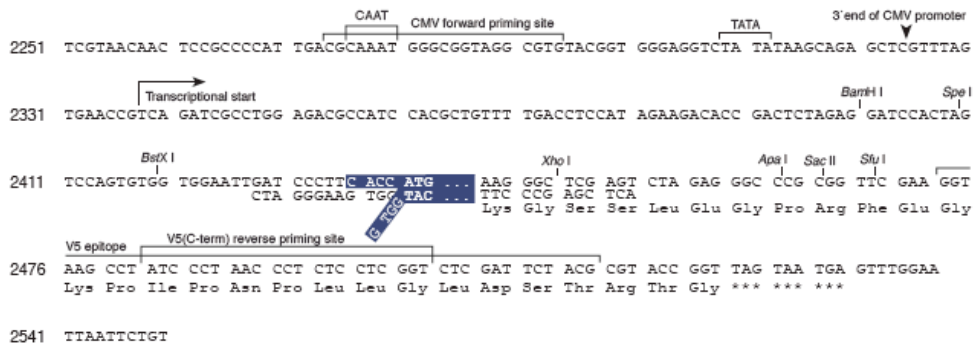
MAP



Comments for pLenti6/V5-D-TOPO® 6963 nucleotides

RSV enhancer/promoter: bases 1-229
 HIV-1 5' LTR: bases 230-410
 5' splice donor: base 520
 HIV-1 psi (ψ) packaging sequence: bases 521-565
 HIV-1 Rev response element (RRE): bases 1075-1308
 3' splice acceptor: base 1656
 3' splice acceptor: base 1684
 CMV promoter: bases 1809-2392
 CMV forward priming site: bases 2274-2294
 Directional TOPO® site: bases 2431-2444
 V5 epitope: bases 2473-2514
 V5(C-term) reverse priming site: bases 2482-2502
 SV40 early promoter and origin: bases 2569-2877
 EM7 promoter: bases 2932-2998
 Blastidin resistance gene: bases 2999-3397
 ΔU3/HIV-1 3' LTR: bases 3484-3717
 ΔU3: bases 3484-3536
 Truncated HIV-1 3' LTR: bases 3537-3717
 SV40 polyadenylation signal: bases 3789-3920
bla promoter: bases 4779-4877
 Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 4878-5738
 pUC origin: bases 5883-6556

POLYLINKER & CLONING SEQUENCING PRIMERS



Biosafety Features of the System

Introduction The ViraPower™ Lentiviral Expression System is a third-generation system based on lentiviral vectors developed by Dull *et al.*, 1998. This third-generation lentiviral system includes a significant number of safety features designed to enhance its biosafety and to minimize its relation to the wild-type, human HIV-1 virus. These safety features are discussed below.

Biosafety

Features of the

ViraPower™

Lentiviral System

The ViraPower™ Lentiviral Expression System includes the following key safety features:

- The pLenti expression vector contains a deletion in the 3' LTR (Δ U3) that does not affect generation of the viral genome in the producer cell line, but results in "self-inactivation" of the lentivirus after transduction of the target cell (Yee *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 1986; Zufferey *et al.*, 1998). Once integrated into the transduced target cell, the lentiviral genome is no longer capable of producing packageable viral genome.
- The number of genes from HIV-1 that are used in the system has been reduced to three (*i.e.* *gag*, *pol*, and *rev*).
- The VSV-G gene from Vesicular Stomatitis Virus is used in place of the HIV-1 envelope (Burns *et al.*, 1993; Emi *et al.*, 1991; Yee *et al.*, 1994).
- Genes encoding the structural and other components required for packaging the viral genome are separated onto four plasmids. All four plasmids have been engineered not to contain any regions of homology with each other to prevent undesirable recombination events that could lead to the generation of a replication-competent virus (Dull *et al.*, 1998).
- Although the three packaging plasmids allow expression *in trans* of proteins required to produce viral progeny (*e.g.* *gal*, *pol*, *rev*, *env*) in the 293FT producer cell line, none of them contain LTRs or the Ψ packaging sequence. This means that none of the HIV-1 structural genes are actually present in the packaged viral genome, and thus, are never expressed in the transduced target cell. No new replication-competent virus can be produced.
- The lentiviral particles produced in this system are replication-incompetent and only carry the gene of interest. No other viral species are produced.
- Expression of the *gag* and *pol* genes from pLP1 has been rendered Revdependent by virtue of the HIV-1 RRE in the *gag/pol* mRNA transcript. Addition of the RRE prevents *gag* and *pol* expression in the absence of Rev (Dull *et al.*, 1998).
- A constitutive promoter (RSV promoter) has been placed upstream of the 5' LTR in the pLenti expression vector to offset the requirement for Tat in the efficient production of viral RNA (Dull *et al.*, 1998).

continued on next page

Biosafety Features of the System, continued

Biosafety Level 2

Despite the inclusion of the safety features discussed on the previous page, the lentivirus produced with this System can still pose some biohazardous risk since it can transduce primary human cells. For this reason, **we highly recommend that you treat lentiviral stocks generated using this System as Biosafety Level 2 (BL-2) organisms and strictly follow all published BL-2 guidelines with proper waste decontamination.** Furthermore, exercise extra caution when creating lentivirus carrying potential harmful or toxic genes (*e.g.* activated oncogenes).

For more information about the BL-2 guidelines and lentivirus handling, refer to the document, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4th Edition, published by the Centers for Disease Control (CDC). This document may be downloaded at the following address:

<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl4/bmbl4toc.htm>

Handle all lentiviruses in compliance with established institutional guidelines. Since safety requirements for use and handling of lentiviruses may vary at individual institutions, we recommend consulting the health and safety guidelines and/or officers at your institution prior to use of the ViraPower™ Lentiviral Expression System.

ANEXO 2

**NOTIFICACIÓN SOBRE OPERACIONES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE**

Nº de Registro:	Nº de Notificación:
------------------------	----------------------------

ANEXO 2.

Colina Quinasa alfa (mRNA)

- **Homo sapiens** choline kinase alpha (CHKA), transcript variant 1, mRNA.
NM_001277, 2733 bp.
- Chromosome: 11; Location: 11q13.2

CDS 215..1588

GGCAGAGGAGCGAGTGCAGCGGCCAGCAGCACATCCCCGCTCCACAGTCGCCCGCAGTCGCCGCAGCCGCC
GCCGCCGCCCGCGCGCCCAACCGCCGCGGCCCCCTGCCCGCCGGCCTGCCAGTGAGAGAGCGGCGAGG
GGGCGCCCGGCCGACTCTGAGCCTAGTCCTCTCGCGCTGCGGCCGCCCGCCCTCTCGGCCGCCTGTCT
GGGCATGAAAACCAAAATCTGCACCGGGGGCGAGGCGGAGCCCTCGCCGCTCGGGCTGCTGCTGAGCTGC
GGTAGCGGCAGCGCGGCCCGGCGCCCGGCGTGGGGCAGCAGCGCGACGCCGCCAGCGACCTCGAGTCCA
AGCAGCTGGGCGGCCAACAGCCGCCGCTCGCGCTGCCCCCTCCGCCGCCGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCT
GCCCCAGCCCCGCCGCCAGCCGCCCGCAGACGAGCAGCCGGAGCCCCGGACGCGGCGCAGGGCCTAT
CTGTGGTGCAAGGAGTTCCTGCCC GGCGCCTGGCGGGGCTCCGCGAGGACGAGTTCACATCAGTGTCA
TCAGAGGCGGCTTAGCAACATGCTGTTCCAGTGTCCCTACCTGACACCACAGCCACCCTTGGTGATGA
GCCTCGGAAAGTGTCTCTGCGGCTGTATGGAGCGATTTTGCAGATGAGGTCTGTAATAAAGAGGGATCC
GAACAAGCTCAGAAAAGAAAATGAATTTCAAGGGGCTGAGGCCATGGTTCTGGAGAGCGTTATGTTGCCA
TTCTCGCAGAGAGGTCACCTTGGGCCAA AACTCTATGGCATCTTTCCCCAAGGCCGACTGGAGCAGTTCAT
CCCGAGCCGGCGATTAGATACTGAAGAATTAAGTTTGCCAGATATTTCTGCAGAAATCGCCGAGAAAATG
GCTACATTTTATGTTATGAAAATGCCATTCATAAAGGAACCAAAATGGCTTTTTTGGCACAATGGAAAAGT
ATCTAAAGGAAGTGTGAGAATTAATTTACTGAGGAATCCAGAATTA AAAAGCTCCACAAATTGCTCAG
TTACAATCTGCCCTTGGAAGTGGAAAACCTGAGATCATGCTTGAATCTACTCCATCTCCAGTTGTATTT
TGTCATAATGACTGTCAAGAAGGTAATATCTTGTGCTGGAAGGCCGAGAGAATTCTGAAAAACAGAAAC
TGATGCTCATTGATTTTGAATACAGCAGTTACAATTACAGGGGATTCGACATTTGAAATCACTTCTGTGA
GTGGATGTATGATTATAGCTATGAAAAATACCCTTTTTTTTTCAGAGCAAACATCCGGAAGTATCCCACCAAG
AAACAACAGCTCCATTTTATTTCCAGTTACTTGCCTGCATTC AAAATGACTTTGAAAACCTCAGTACTG
AAGAAAAATCCATTATAAAAAGAAAATGTTGCTTGAAGTTAATAGGTTTGCCTTGCATCTCATTTCCT
CTGGGGACTGTGGTCCATTGTACAAGCCAAGATTTTATCTATTGAATTTGGGTACATGGACTACGCCCAA
GCAAGGTTTGTATGCCTATTTCCACCAGAAGAGGAAGCTTGGGGTGTGACTGTGGGGAGGACTCCATCCAC
CTCATCACTGGACTGCATGGGGAGGCAGCAGAGCGGGTCCCCTCTGTGCTTCGACTACTGCTCCTGTGG
CAGGAGGCTTTGGGTGGCTCACTACTGAACACATGTGTATGATACTAAAGACGGTATTA AAATGGAGCGA
CGTTTATTTTATCTCTTGTACGATTTTACTAGGACTCAGAAACGAGATCGGGAAGCAGAAATATAGTG
CAATAGTGCAACATCTCTGAATCCTTTTAATCTAGAGAAGGCATTTTATATTTGGGGGCTAAGGTTTCCA
GTCAGATGAGGCAAACAGCAAGAGTAAGCAGTGTACTTGCAGGTACTTTGGTTAATGTTGATTTAAATT
TTCATGAATGTGCTGGTGAACACTGTGACCAGGCTTTTGTAGATGGCGATGTGTTATAGACGGTGCTCAC

TCCCAAGGGACAGCAAGTGAGCAGAGATGTACTGCAAAGTCGCCAGTCACTGCTGCAAGGTGGCCTCTGC
CTGGGGCCTCCAGAAGCTGCTCCTTTACCTCTTGGTCCCATGGCTGAAGCTGGAGCAGCGGATTGCTCT
GGAGCAGCCAAGGCCGCCAGCGTGTGGAGCAGAGCTCTCCCCTCCTGCTGGGCGTGTGTGACACTGATGA
GTTTCACTGTACTGCATGTGACTTCTCCCCTGCCCTTCTCCTGATGGAGTGTGCAGACAGCCATGCGTG
GCCACGGGGGAGTGTGAGGACCTCCCTGTCTCCCGGCTCCCCTCCCAGGGGAGCCAGCTGCTTGACCTA
GCTCTTTGGGCTCTCCTGCCCTCTGCTCTGCCTGGAGTGTCCGATCCTGTGAGTAGGCTGGGCTCCCC
TGGGCAGGGTTCTCCAAGGGCCCGGTTTCCCGGCCCTTACCTTTTCTGATGCCCTGACATCATCATTCT
TGTGGGAGACAGCAGCCTGTATGTGGTGTGGGCGTGGATCGAGTGTAGCTGTGAAATCCATATATATGA
AATGTCCTGCGGGATACAGTCTTAGCTGACTTTTTTTTTACTCTGAACTCTTATTTGAATTGTTTTTTGTG
CATATATTTCTGCTACCACAGAGATTGTACTATACAAATAAAAAATAAAAAACCCAAAAA
AAA

Homo sapiens choline kinase alpha (CHKA), transcript variant 2, mRNA

>GI|47078277|ref|NM_212469.1|

2679 bp

chromosome: 11; Location: 11q13.2

CDS 215.. 1534

GGCAGAGGAGCGAGTGCAGCGGCCAGCAGCACATCCCCGCTCCACAGTCGCCGAGTCGCCGCAGCCGCC
GCCGCCGCCCGCGCGCCAACCGCCGCGCCCCCTGCCCGCCGGCTGCCAGTGAAGAGAGCGGCGAGG
GGGCGCCCGGCCGACTCTGAGCCTAGTCTCTCGCGCTGCGGCCGCCCGCGCCTCCTCGGCCGCCTGTC
GGGCATGAAAACCAAAATCTGCACCGGGGGCGAGGCGGAGCCCTCGCCGCTCGGGCTGCTGCTGAGCTGC
GGTAGCGGCAGCGCGGCCCGCGCGCCGGCGTGGGGCAGCAGCGCGACGCCCGCCAGCGACCTCGAGTCCA
AGCAGCTGGGCGGCCAACAGCCGCCGCTCGCGCTGCCCCCTCCGCCGCCGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCT
GCCCCAGCCCCCGCGCCGAGCCGCCGAGACGAGCAGCCGGAGCCCCGGACGCGGCGCAGGGCCTAT
CTGTGGTGCAAGGAGTTCTGCCCGCGCCTGGCGGGGCTCCGCGAGGACGAGTTCCACATCAGTGTCA
TCAGAGGCGGCCCTAGCAACATGCTGTTCCAGTGTCCCTACCTGACACCACAGCCACCCTTGGTGATGA
GCCTCGGAAAAGTGTCTCCTGCGGCTGTATGGAGCGATTTTGCAGATGGGGGCTGAGGCCATGTTTCTGGAG
AGCGTTATGTTTGCCATTCTCGCAGAGAGGTCACCTGGGCCAAAACCTCTATGGCATCTTTCCCCAAGGCC
GACTGGAGCAGTTCATCCCAGCCGGCGATTAGATACTGAAGAATTAAGTTTGCCAGATATTTCTGCAGA
AATCGCCGAGAAAAATGGCTACATTTTCATGGTATGAAAATGCCATTCAATAAGGAACCAAAATGGCTTTTT
GGACAATGGAAAAGTATCTAAAGGAAGTGTGAGAATTAATTTACTGAGGAATCCAGAATTA AAAAGC
TCCACAAATTGCTCAGTTACAATCTGCCCTTGGAACTGGAAAACCTGAGATCATTGCTTGAATCTACTCC
ATCTCCAGTTGTATTTTGTGCATAATGACTGTCAAGAAGGTAATATCTTGTGCTGGAAGGCCGAGAGAAT
TCTGAAAAACAGAACTGATGCTCATTGATTTTCAATAACAGCAGTTACAATTACAGGGGATTTCGACATTG
GAAATCACTTCTGTGAGTGGATGTATGATTATAGCTATGAAAAATACCCTTTTTTTCAGAGCAAACATCCG
GAAGTATCCCACCAAGAAACAACAGCTCCATTTTATTTCCAGTTACTTGCCTGCATTCCAAATGACTTT
GAAAACCTCAGTACTGAAGAAAAATCCATTATAAAAAGAAGAAATGTTGCTTGAAGTTAATAGGTTTGCC
TTGCATCTCATTTTCTCTGGGGACTGTGGTCCATTGTACAAGCCAAGATTTTCATCTATTGAATTTGGGTA
CATGGACTACGCCCAAGCAAGGTTTGATGCCTATTTCCACCAGAAGAGGAAGCTTGGGGTGTGACTGTGG

GGAGGACTCCATCCACCTCATCACTGGACTGCATGGGGAGGCAGCAGAGCGGGGTCCCCCTCTGTGCTTCG
ACTACTGCTCCTGTGGCAGGAGGCTTTGGGTGGCTCACTACTGAACACATGTGTATGATACTAAAGACGG
TATTA AAAATGGAGCGACGTTTATTTTCATCTCTTGTTTACGATTTCACTAGGACTCAGAAACGAGATCGGG
AAGCAGAAAATATAGTGCAATAGTGCAACATCTCTGAATCCTTTTAATCTAGAGAAGGCATTTTCATATTTG
GGGGCTAAGGTTTCCAGTCAGATGAGGCAAACAGCAAGAGTAAGCAGTGTACTTGCAGGTACTTTGGTT
AATGTTGATTTAAATTTTCATGAATGTGCTGGTGAACACTGTGACCAGGCTTTTGTAGATGGCGATGTGT
TATAGACGGTGTCTCACTCCCAAGGGACAGCAAGTGAGCAGAGATGTACTGCAAAGTCGCCAGTCACTGCT
GCAAGGTGGCCTCTGCCTGGGGCTCCAGAAGCTGCTCCTTTACCCTCTTGGTCCCATGGCTGAAGCTGG
AGCAGCGGATTGCTCTGGAGCAGCCAAGGCCGCCAGCGTGTGGAGCAGAGCTCTCCCCTCTGCTGGGCG
TGTGTGACACTGATGAGTTTCACTGTACTGCATGTGACTTCTCCCCTGCCCTTCTCCTGATGGAGTGTG
CAGACAGCCATGCGTGGCCACGGGGCAGTGTGAGGACCTCCCTGTCTCCCGGCTCCCCTCCCAGGGGAG
CCAGCTGCTTGACCTAGCTCTTTGGGCCTCTCCTGCCCTCTGCTCTGCCCTGGAGTGTCCGATCCTGTGAG
TAGGCTGGGCCTCCCCTGGGCAGGTTCTCCAAGGGCCCGGTTTCCCGGCCCTTACCTTTCTGATGCC
CTGACATCATCATTTCTTGTGGGAGACAGCAGCCTGTATGTGGTGTGGGGCGTGGATCGAGTGTAGCTGTG
AAATCCATATATATGAAAATGTCTGCGGGATACAGTCTTAGCTGACTTTTTTTTTACTCTGAACTCTTATT
TGAATTGTTTTTTGTGCATATATTTCTGCTACCACAGAGATTGTACTATACAAATAAAAAAATAAAAACC
CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Colina Quinasa beta (mRNA).

Homo sapiens choline kinase beta (CHKB), transcript variant 1, mRNA

GI:23238259 NM_005198 1595 bp

Chromosome: 22; Location: 22q13.33

CDS 185..1372

CCCCGGCCGGGGCACGGAGAGAGCCGAGCGCCGAGCCGTGAGCCGAATAGAGCCGGAGAGACCCGAGTA
TGACCGGAGAAGCCCAGGCCGGCCGGAAGAGAGCCGAGCGCGCCGGAAGGAACCGAGCCCGTCCGAAG
GGAGCGGAGCGCAGCCTGGCCTGGGGCCCGGTTCGAGCCCGCGCCATGGCGGCCGAGGCGACAGCTGTGGC
CGGAAGCGGGGCTGTTGGCGGCTGCCCTGGCCAAAGACGGCTTGCAGCAGTCTAAGTGCCCGGACACTACC
CCAAAAACGGCGGCGCGCCTCGTTCGCTGTTCGCGTGACGCCGAGCGCCGAGCCTACCAATGGTGCCGGGAGT
ACTTGGGCGGGGCTGGCGCCGAGTGCAGCCGAGGAGCTGAGGGTTTACCCCGTGTAGCGGAGGCCTCAG
CAACCTGCTCTTCCGCTGCTCGCTCCCGGACCACCTGCCAGCGTTGGCGAGGAGCCCCGGGAGGTGCTT
CTGCGGCTGTACGGAGCCATCTTGCAGGGCGTGGACTCCCTGGTGTAGAAAGCGTGATGTTTCGCCATAC
TTGCGGAGCGGTTCGCTGGGGCCCCAGCTGTACGGAGTCTTCCCAGAGGGCCGGCTGGAACAGTACATCCC
AAGTCGGCCATTGAAAACCAAGAGCTTCGAGAGCCAGTGTGTCAGCAGCCATTGCCACGAAGATGGCG
CAATTTTCATGGCATGGAGATGCCTTTACCAAGGAGCCCCACTGGCTGTTTGGGACCATGGAGCGGTACC
TAAAACAGATCCAGGACCTGCCCCAACTGGCCTCCCTGAGATGAACCTGCTGGAGATGTACAGCCTGAA
GGATGAGATGGGCAACCTCAGGAAGTTACTAGAGTCTACCCCATCGCCAGTCGTCTTCTGCCACAATGAC
ATCCAGGAAGGGAACATCTTGTGCTCTCAGAGCCAGAAAATGCTGACAGCCTCATGCTGGTGGACTTCG
AGTACAGCAGTTATAACTATAGGGGCTTTGACATTGGGAACCATTTTTGTGAGTGGGTTTATGATTATAC
TCACGAGGAATGGCCTTTCTACAAAGCAAGGCCACAGACTACCCCACTCAAGAACAGCAGTTGCATTTT

ATTCGTCATTACCTGGCAGAGGCAAAGAAAGGTGAGACCCCTCTCCAAGAGGAGCAGAGAAAACCTGGAAG
AAGATTTGCTGGTAGAAGTCAGTCGGTATGCTCTGGCATCCATTTCTTCTGGGGTCTGTGGTCCATCCT
CCAGGCATCCATGTCCACCATAGAATTTGGTTACTTGGACTATGCCAGTCTCGGTCCAGTTCTACTTC
CAGCAGAAGGGGCAGCTGACCAGTGTCCACTCCTCATCCTGACTCCACCCTCCACTCCTTGGATTTCTC
CTGGAGCCTCCAGGGCAGGACCTTGGAGGGAGGAACAACGAGCAGAAGGCCCTGGCGACTGGGCTGAGCC
CCCAAGTGAACTGAGGTTTCCAGGAGACCGCCTGTTCCCTGAGTTTGTAGTAGGTCCCATGGCTGGCAGGC
CAGAGCCCCGTGCTGTGTATGTAACACAATAACAAGCTTCTTCTTCCCACCCTG

Homo sapiens choline kinase beta (CHKB), transcript variant 2, mRNA

>gi|23238260|ref|NM_152253.1 4914 bp
chromosome: 22; Location: 22q13.33

CDS 185..568

CCCGGGCCGGGGCACGGAGAGAGCCGAGCGCCGAGCCGTGAGCCGAATAGAGCCGGAGAGACCCGAGTA
TGACCGGAGAAGCCAGGCGCGCCGGAAGAGGAGCCGAGCGCGCCGGAAGGAACCGAGCCCGTCCGAAG
GGAGCGGAGCGCAGCCTGGCCTGGGGCCCGGTGAGCCCGCGCCATGGCGCGCCGAGGCGACAGCTGTGGC
CGGAAGCGGGGCTGTTGGCGGCTGCCTGGCCAAAGACGGCTTGCAGCAGTCTAAGTGCCCGGACACTACC
CCAAAACGGCGCGCGCCTCGTTCGCTGTTCGCGTGACGCCGAGCGCCGAGCCTACCAATGGTGGCGGGAGT
ACTTGGGCGGGGCTGGCGCCGAGTGCAGCCCGAGGAGCTGAGGGTTTACCCCGTGAGGTGGGAGGTCAG
GGGTGAGCCTCTCCGGTGCAGCGATCGGGGTCAGGGGTCAGCCGCGGGGCCCTCAGGATGCTCCATGTTT
TCGCCCCCTCTTTCGCCCCGCGCTGGGGCGGGGCGGGGCCGCGCTGGCCGGGAGGGGGCCGGGGCCGCG
GCAGGTAGGGCCGGCCGCGGGCTGAGCGCGCCTGGTGTGGGTCTGCAGCGGAGGCCTCAGCAACCTGCTC
TTCCGCTGCTCGCTCCCGGACCACCTGCCAGCGTTGGCGAGGAGCCCCGGGAGGTGCTTCTGCGGCTGT
ACGGAGCCATCTTGCAGGTGAGGGGGGTGTGAGCGCCGAGCACCAGTGGCTTTAGGGCCTGTTCGCTTAC
GCGATGCGGGTAGTATTGTTCCCGTTGCGCAGTTGAGGACACCGAGGTTTACGGTCTGAGTAACACCTCA
TTACACCGAAGCCTGGGCCTGTATTCCCAGAGCTTTGGGAGGCTGAGGCGAGAGGATCACTTGCAGCAG
GAGTTTCGAGACCAGCCTGGACAACATAGTGCAGACCCCATCTCTAAATAAAAATAGACCAACGCTAAAGC
CTGTGCTCCAGAGCCTCCAGGCAATTGGATCAGAAGTCGAGCTCTGGTGGGAGGAAGGCGAGCCCTCAT
GTGTGTCCCTGTGCCACTTTGCCTTGGCCCCCTTTGCTGTCCATCCTTTTTTTCAGGGCGTGGACTCCCTGGT
GCTAGAAAAGCGTGATGTTCCGACACTTGGCGAGCGGTGCTGGGGCCCCAGCTGTACGGAGTCTTCCCA
GAGGGCCGGCTGGAACAGTACATCCCAAGTCGGCCATTGAAAACCAAGAGCTTCGAGAGCCAGTGTGT
CAGCAGCCATTGCCACGAAGATGGCGCAATTTTCATGGCATGGAGATGCCTTTTACCAAGGAGCCCCACTG
GCTGTTTGGGACCATGGAGCGGTACCTAAAACAGATCCAGGACCTGCCCCCAACTGGCCTCCCTGAGATG
AACCTGCTGGAGATGTACAGCCTGAAGGATGAGATGGGCAACCTCAGGAAGTTACTAGAGTCTACCCCAT
CGCCAGTCTCTTCTGCCACAATGACATCCAGGAAGGTAGGAGAAGGCATCTGAGTCTCCTAACCCAAGA
TGGAAGAGCCAGAGGGCTCTGGAGTGCAGAACCTCACCCATTCCCCCAGGGAACATCTTGTGCTGCTCT
CAGAGCCAGAAAATGCTGACAGCCTCATGCTGGTGGACTTCGAGTACAGCAGTTATAACTATAGGGGCTT

TGACATTGGGAACCATTTTTGTGAGTGGGTTTATGATTATACTCACGAGGAATGGCCTTTCTACAAAGCA
AGGCCCACAGACTACCCCACTCAAGAACAGCAGTTGCATTTTATTCGTCAATTACCTGGCAGAGGCAAAGA
AAGGTGAGACCCTCTCCCAAGAGGAGCAGAGAAAACCTGGAAGAAGATTTGCTGGTAGAAGTCAGTCGGTA
TGCTCTGGCATCCCATTTCTTCTGGGGTCTGTGGTCCATCCTCCAGGCATCCATGTCCACCATAGAATTT
GGTACTTGGACTATGCCAGTCTCGGTTCCAGTTCTACTTCCAGCAGAAGGGGCAGCTGACCAGTGTCC
ACTCCTCATCCTGACTCCACCTCCCACTCCTTGGATTTCTCCTGGAGCCTCCAGGGCAGGACCTTGGAG
GGAGGAACAACGAGCAGAAGGCCCTGGCGACTGGGCTGAGCCCCAAGTGAAACTGAGGTTTCAGGAGACC
GGCCTGTTCTGAGTTTGTAGTGCCGACCAACCCCAAGGATGGCGGAAGCTCACCAGGCCGTGGCCTTCCA
GTTTACGGTGACCCAGACGGGGTCTGACTTCCGGCTCAGTCGGGAGGCCCTGAAACACGTCTACCTGTCT
GGGATCAACTCCTGGAAGAAACGCCTGATCCGCATCAAGAATGGCATCCTCAGGGGCCTGTACCCTGGCA
GCCCCACCAGCTGGCTGGTCTCATCATGGCAACAGTGGGTTTCTCCTTCTGCAACGTGGACATCTCCTT
GGGGCTGGTCTGAGTTGCATCCAGAGATGCCTCCCTCAGGGGTGTGGCCCCACCAGACCCCGCAGACCCGG
GCACTTCTCAGCATGGCCATCTTCTCCACGGGCTCTGGGTGACGGGCATCTTCTTCTTCCGCCAAACCC
TGAAGCTGCTTCTCTGCTACCATGGGTGGATGTTTGAGATGCATGGCAAGACCAGCAACTTGACCAGGAT
CTGGGCTATGTGTATCCGCCTTCTATCCAGCCGGCACCCCTATGCTCTACAGCTTCCAGACATCTCTGCC
AAGCTTCTGTGCCAGGGTGTGACCCACAATTCAGCGGTACCTAGAGTCTGTGCGCCCCCTTGTGGATG
ATGAGGAATATTACCGCATGGAGTTGCTGGCCAAAGAATTCAGGACAAGACTGCCCCCAGGCTGCAGAA
ATACCTGGTGCTCAAGTCATGGTGGGCAAGTAACATATGTGAGTGACTGGTGGGAAGAGTACATCTACCTT
CGAGGCAGGAGCCCTCTCATGGTGAACAGCAACTATTATGTCATGGACCTTGTGCTCATCAAGAATACAG
ACGTGCAGGCAGCCCGCTGGGAAACATCATCCACGCCATGATCATGTATCGCCGTAAACTGGACCGTGA
AGAAATCAAGCCTGTGATGGCACTGGGCATAGTGCCATATGTGCTCCTACCAGATGGAGAGGATGTTCAAC
ACCACTCGGATCCCGGGCAAGGACACAGATGTGCTACAGCACCTCTCAGACAGCCGGCACGTGGCTGTCT
ACCACAAGGGACGCTTCTTCAAGCTGTGGCTCTATGAGGGCGCCCGTCTGCTCAAGCCTCAGGATCTGGA
GATGCAGTTCAGAGGATCCTGGACGACCCCTCCCCACCTCAGCCTGGGGAGGAGAAGCTGGCAGCCCTC
ACTGCAGGAGGAAGGGTGGAGTGGGCGCAGGCACGCCAGGCCTTCTTTAGCTCTGGAAAGAATAAGGCTG
CCTTGGAGGCCATCGAGCGTGGCCGCTTTCTTCTGTTGGCCCTGGATGAGGAATCCTACTCCTATGACCCCGA
AGATGAGGCCAGCCTCAGCCTCTATGGCAAGGCCCTGCTACATGGCAACTGCTACAACAGGTGGTTTTGAC
AAATCCTTCACTCTCATTTCTTCAAGAATGGCCAGTTGGGTCTCAATGCAGAGCATGCGTGGGCAGATG
CTCCCATCATTTGGGCACCTCTGGGAGTTTGTCTGGGCACAGACAGCTTCCACCTGGGCTACACGGAGAC
CGGGCACTGCCTGGGCAAACCGAACCCTGCGCTCGCACCTCCTACACGGCTGCAGTGGGACATTCAAAA
CAGTGCCAGGCGGTCATCGAGAGTTCTTACCAGGTGGCCAAGGCGTTGGCAGACGACGTGGAGTTGTACT
GCTTCCAGTTCTTCCCTTTGGCAAAGGCCCTCATCAAGAAGTGCCGGACCAGCCCTGATGCCTTTGTGCA
GATCGCGTGCAGCTGGCTCACTTCCGGGGTAAGTTCTGCCTGACCTATGAGGCCTCAATGACCAGAAT
GTTCCGGGAGGGACGGACTGAGACTGTGCGTTCTGTACCAGCGAGTCCACAGCCTTTGTGCAGGCCATG
ATGGAGGGTCCCACACAAAAGCAGACCTGCGAGATCTCTTCCAGAAGGCTGCTAAGAAGCACCAGAATA
TGTACCGCCTGGCCATGACCGGGCAGGGATCGACAGGCACCTCTTCTGCCTTTACTTGGTCTCCAAGTA
CCTAGGAGTCAGCTCTCCTTTCTTGGTGTGAGGTGCTCTCGGAACCCTGGCGTCTCTCCACCAGCCAGATC
CCCCAATCCCAGATCCGCATGTTTCGACCCAGAGCAGCACCCCAATCACCTGGGCGCTGGAGGTGGCTTTG
GCCCTGTAGCAGATGATGGCTATGGAGTTTCTTACATGATTGCAGGCGAGAACACGATCTTCTTCCACAT
CTCCAGCAAGTTCTCAAGCTCAGAGACGAACGCCAGCGCTTTGGAAACCACATCCGCAAAGCCCTGCTG
GACATTGCTGATCTTTTCCAAGTTCCCAAGGCCTACAGCTGAAGGTTGGAGAAATGCCAGCTGCCCTTTC

GTCCCCACACTGTGGAGGAAGGGACCTGTGGCAGCTCACAGGCATGAGGGGTGGCCGTGCACAGGTGCC
AGGCTCCAAGGACAGCTCCGGCAGCAGGTCCCTCGCTGGGCAGATGCTGCTCCCTGAGGGCCAGGTGGT
GAGCCCTTAGGTACCTGTGTTTTGTTGGGAACTCGGAGGCCCTCCCCCTCCCCAGCTCAGACCACAGA
GGTGGAAGAGAAGGGCTGAAGCTGGAAGACTGTTTCATGAGGGACTTGTGTGACCTGCTTTGAAATGTGT
GACTCTGCTGAGTGACGTAGGCTCTGAGATAGCTGTCCACGCCACGTGTTTGCTTGAATAAATACTTG
CCTCAGAACCTTCA

Rho A wt (mRNA):

Homo sapiens ras homolog gene family, member A (RHOA), mRNA 1926 bp
>gi|50593005|ref|NM_001664.2|
chromosome: 3; Location: 3p21.
CDS 277..858

GTGGATGAGCTGTGAGTGCGCGCGCTGCGCGGGGCCGACCTGTGCCGGCTCGAGCCCGCTGGGCACT
CGGAGGCGCGCACGTGTTCCCGCCCTCCCGCCGCCGCCCGCCCTCGTCTCTCGCGCTACCCTCCCGC
CGCCCGCGGTCCCTCCGTCGGTTCTCTCGTTAGTCCACGGTCTGGTCTTCAGCTACCCGCCTTCGTCTCCG
AGTTTGCGACTCGCGGACCGGCGTCCCCGGCGCAAGAGGCTGGACTCGGATTCGTTGCCTGAGCAATGG
CTGCCATCCGGAAGAACTGGTGATTTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTCTT
CAGCAAGGACCAGTTCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTGTTGAGAACTATGTGGCAGATATCGAGGTG
GATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCAGGAAGATTATGATCGCCTGAGGCCCC
TCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTTCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACAT
CCCAGAAAAGTGGACCCCAAGTCAAGCATTCTGTCCCAACGTGCCATCATCCTGGTTGGGAATAAG
AAGGATCTTCGGAATGATGAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTG
AAGAAGGCAGAGATATGGCAAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTCAGCAAAGACCAAAGA
TGGAGTGAGAGAGGTTTTTGAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGGAAGAAAAAATCT
GGGTGCCTTGTCTTGTGAACCTTGCTGCAAGCACAGCCCTTATGCGGTTAATTTTGAAGTGTGTTTAT
TAATCTTAGTGTATGATTACTGGCCTTTTTTCATTTATCTATAATTTACCTAAGATTACAAATCAGAAGTC
ATCTTGCTACCAGTATTTAGAAGCCAACATGATTATTAACGATGTCCAACCCGTCTGGCCACCAGGGT
CCTTTTGACACTGCTCTAACAGCCCTCCTCTGCACTCCACCTGACACACCAGGCGCTAATTCAAGGAAT
TTCTTAACTTCTTGCTTCTTTCTAGAAAAGAGAAACAGTTGGTAACCTTTTGTGAATTAGGCTGTAACACT
TTATAACTAACATGTCTGCCTATTATCTGTCAGCTGCAAGGTACTCTGGTGAGTCACCACTTCAGGGCT
TTACTCCGTAACAGATTTTGTGGCATAGCTCTGGGGTGGGCAGTTTTTTGAAAATGGGCTCAACCAGAA
AAGCCCAAGTTCATGCAGCTGTGGCAGAGTTACAGTTCGTGGTTTTTCATGTTAGTTACCTTATAGTTACT
GTGTAATTAGTGCCACTTAATGTATGTTACCAAAAATAAATATATCTACCCAGACTAGATGTAGTATTT
TTTGATAAATTGGATTTCCCTAATACTGTCATCCTCAAAGAAAGTGTATTGGTTTTTTAAAAAAGAAAGTG
TATTTGAAAATAAAGTCAGATGGAAAATTCATTTTTTAAATTTCCCGTTTTTGTCACTTTTTCTGATAAAAG
ATGGCCATATTACCCCTTTTCGGCCCCATGTATCTCAGTACCCCATGGAGCTGGGCTAAGTAAATAGGAA
TTGGTTTCACGCCTGAGGCAATTAGACACTTTGGAAGATGGCATAACCTGTCTCACCTGGACTTAAGCAT
CTGGCTCTAATTCACAGTGCTCTTTTCTCCTCACTGTATCCAGGTTCCCTCCCAGAGGAGCCACCAGTTC
TCATGGGTGGCACTCAGTCTCTCTCTCTCCAGCTGACTAACTTTTTTTTCTGTACCAGTTAATTTTTTCC

AACTACTAATAGAATAAAGGCAGTTTTCTAAAAAAA

RhoA QL (mut) mRNA:

Homo sapiens ras homolog gene family, member A (RHOA), mRNA 1926 bp
>gi|50593005|ref|NM_001664.2|
chromosome: 3; Location: 3p21.
CDS 277..858

RhoA Q63L (A188T)

GTGGATGAGCTGTGAGTGC GCGCGCGTGC GCGGGGCCGCGACCTGTGCCGGCTCGAGCCCGCTGGGCACT
CGGAGGCGCGCACGTCGTTCCCGGCCCTCCCGCCGCCGCCCGCCCTCGCTCTCTCGCGCTACCCTCCCGC
CGCCCGCGGTCTCCGTCGGTTCTCTCGTTAGTCCACGGTCTGGTCTTCAGCTACCCGCCTTCGTCTCCG
AGTTTGC GACTCGCGGACCGGCGTCCCCGGCGCGAAGAGGCTGGACTCGGATTCGTTGCCTGAGCAATGG
CTGCCATCCGGAAGAACTGGTGATTGTTGGTGATGGAGCCTGTGGAAAGACATGCTTGCTCATAGTCTT
CAGCAAGGACCAGTCCCAGAGGTGTATGTGCCACAGTGTGTTGAGAACTATGTGGCAGATATCGAGGTG
GATGGAAAGCAGGTAGAGTTGGCTTTGTGGGACACAGCTGGGCCTGGAAGATTATGATCGCCTGAGGCCCC
TCTCCTACCCAGATACCGATGTTATACTGATGTGTTTTCCATCGACAGCCCTGATAGTTTAGAAAACAT
CCCAGAAAAGTGGAACCCAGAAAGTCAAGCATTTCTGTCCCAACGTGCCATCATCCTGGTTGGGAATAAG
AAGGATCTTCGGAATGATGAGCACACAAGGCGGGAGCTAGCCAAGATGAAGCAGGAGCCGGTGAAACCTG
AAGAAGGCAGAGATATGGCAAACAGGATTGGCGCTTTTGGGTACATGGAGTGTTTCAGCAAAGACCAAAGA
TGGAGTGAGAGAGGTTTTTGAATGGCTACGAGAGCTGCTCTGCAAGCTAGACGTGGGAAGAAAAAATCT
GGGTGCCTTGCTTGTGA AACCTTGCTGCAAGCACAGCCCTTATGCGGTTAATTTTGAAGTGCTGTTTAT
TAATCTTAGTGATGATTACTGGCCTTTTTTCATTTATCTATAATTTACCTAAGATTACAAATCAGAAGTC
ATCTTGCTACCAGTATTTAGAAGCCAACTATGATTATTAACGATGTCCAACCCGTCTGGCCCACCAGGGT
CCTTTTGACACTGCTCTAACAGCCCTCCTCTGCACTCCCACCTGACACACCAGGCGCTAATTCAGGAAT
TTCTTAACTTCTTGCTTCTTTCTAGAAAAGAGAAACAGTTGGTAACTTTTGTGAATTAGGCTGTAACTACT
TTATAACTAACATGTCTGCCTATTATCTGTCTGAGCTGCAAGGTACTCTGGTGAGTCACTTTCAGGGCT
TTACTCCGTAACAGATTTTGTGGCATAGCTCTGGGGTGGGCAGTTTTTTGAAAATGGGCTCAACCAGAA
AAGCCCAAGTTCATGCAGCTGTGGCAGAGTTACAGTTCGTGGTTTTTCATGTTAGTTACCTTATAGTTACT
GTGTAATTAGTGCCACTTAATGTATGTTACCAAAAATAAATATATCTACCCAGACTAGATGTAGTATTT
TTTGTATAATTGGATTTCCTAATACTGTCATCCTCAAAGAAAGTGATTTGGTTTTTTAAAAAAGAAAGTG
TATTTGAAAATAAAGTCAGATGAAAAATTCATTTTTTAAATCCCCTTTTGTCACTTTTTCTGATAAAAG
ATGGCCATATTACCCCTTTTCGGCCCCATGTATCTCAGTACCCCATGGAGCTGGGCTAAGTAAATAGGAA
TTGGTTTTACGCCTGAGGCAATTAGACACTTTGGAAGATGGCATAACCTGTCTCACCTGGACTTAAGCAT
CTGGCTCTAATTCACAGTGCTCTTTTCTCCTCACTGTATCCAGGTTCCCTCCCAGAGGAGCCACCAGTTC
TCATGGGTGGCACTCAGTCTCTTCTCTCCAGCTGACTAACTTTTTTTCTGTACCAGTTAATTTTTTCC
AACTACTAATAGAATAAAGGCAGTTTTCTAAAAAAA

Rac1wt (mRNA):

Homo sapiens ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1) (RAC1), transcript variant Rac1, mRNA 2341 bp

>gi|156071503|ref|NM_006908.4|

chromosome: 7; Location: 7p2

CDS 242..820

GGGAGGCCGGATGTGAGTGGAGCGGCCATTTCTGTTTCTCTGCAGTTTTCTCAGCTTTGGGTGGTGGC
CGCTGCCGGGCATCGGCTTCCAGTCCGCGGAGGGCGAGGCGGCGTGGACAGCGGCCCCGGCACCCAGCGC
CCCGCCGCCGCAAGCCGCGGCCGTCGCCGCGCCCCGAGCCCGCCGCTTCTATCTCAGCGCCCTGC
CGCCGCCGCCGCGGCCAGCGAGCGGCCCTGATGCAGGCCATCAAGTGTGTGGTGGTGGGAGACGGAGCT
GTAGGTAAAACCTTGCCACTGATCAGTTACACAACCAATGCATTTCTGGAGAATATATCCCTACTGTCT
TTGACAATTATTCTGCCAATGTTATGGTAGATGGAAAACCGGTGAATCTGGGCTTATGGGATACAGCTGG
ACAAGAAGATTATGACAGATTACGCCCCCTATCCTATCCGCAAACAGATGTGTTCTTAATTTGCTTTTCC
CTTGAGTCTGCATCATTGAAAATGTCGGTCAAAGTGGTATCCTGAGGTGCGGCACCCTGTCCCA
ACACTCCCATCATCCTAGTGGGAATAAATTGATCTTAGGGATGATAAAGACACGATCGAGAACTGAA
GGAGAAGAAGCTGACTCCCATCACCTATCCGAGGGTCTAGCCATGGCTAAGGAGATTGGTGTGTAAAA
TACCTGGAGTGCTCGGCGCTCACACAGCGAGGCTCAAGACAGTGTGTTGACGAAGCGATCCGAGCAGTCC
TCTGCCCCCTCCCGTGAAGAAGAGGAAGAGAAAATGCCTGCTGTTGTAAATGTCTCAGCCCCCTCGTTCT
TGGTCTGTCCCTTGGAACTTTGTACGCTTTGCTCAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ACAACGGTGGAGCCTTCGCACTCAATGCCAACTTTTTGTTACAGATTAATTTTTCCATAAAACCATTTTT
TGAACCAATCAGTAATTTAAGGTTTTGTTTGTCTAAATGTAAGAGTTCAGACTCACATTCATTAAAA
TTTAGCCCTAAAATGACAAGCCTTCTTAAAGCCTTATTTTTCAAAGCGCCCCCCCCATTCTTGTTTCA
TTAAGAGTTGCCAAAATACCTTCTGAACTACACTGCATTGTTGTGCCGAGAACCAGGACTGAACTTT
GCAAAGACCTTCGTCTTTGAGAAGACGGTAGCTTCTGCAGTTAGGAGGTGCAGACACTTGCTCTCCTATG
TAGTCTCAGATGCGTAAAGCAGAACAGCCTCCCGAATGAAGCGTTGCCATTGAACTCACCAGTGAGTTA
GCAGCAGTGTTCGACATAACATTTGTACTGTAATGGAGTGAGCGTAGCAGCTCAGCTCTTTGGATCAG
TCTTTGTGATTTTCATAGCGAGTTTTCTGACCAGCTTTTGCAGGATTTTGAACAGAAGTGTATTTCTC
TAATGAAGAATTCGTTTAGCTGTGGGTGTGCCGGTGGGGTGTGTGTGATCAAAGGACAAAGACAGTAT
TTTGACAAAATACGAAGTGGAGATTTACACTACATTTGTACAAGGAATGAAAGTGTACGGGTAAAAACTC
TAAAAGGTTAATTTCTGTCAAAATGCAGTAGATGATGAAAGAAAGGTTGGTATTATCAGGAAATGTTTTCT
TAAGCTTTTCTTTCTTACACCTGCCATGCCTCCCCAAATGGGCATTTAATTCATCTTTAAACTGGT
TGTTCTGTTAGTCGCTAACTTAGTAAGTGCTTTTCTTATAGAACCCCTTCTGACTGAGCAATATGCCTCC
TTGTATTATAAAATCTTTCTGATAATGCATTAGAAGGTTTTTTTTGTCGATTAGTAAAAGTGCTTTCCATG
TTACTTTATTTCAGAGCTAATAAGTGCTTTCCTTAGTTTTCTAGTAACTAGGTGTAATAATCATGTGTTGC
AGCTTTATAGTTTTTAAAAATTTTTAGATAATTTCTTAAACTATGAACCTTCTTAACATCACTGTCTTGCC
AGATTACCGACACTGTCACTTGACCAATACTGACCCCTTTTACCTCGCCACGCGGACACACGCCTCCTG
TAGTCGCTTTGCCTATTGATGTTCCCTTTGGGTCTGTGAGGTTCTGTAAACTGTGCTAGTGTGACGATGT
TCTGTACAACCTAACTCACTGGCGAGAATACAGCGTGGGACCCCTCAGCCACTACAACAGAATTTTTTAA
ATTGACAGTTGCAGAAATGTGGAGTGTTTTTACATTGATCTTTTGCTAATGCAATTAGCATTATGTTTTG
CATGTATGACTTAATAAAATCCTTGAATCATA

Rac1 QL (mut) mRNA:

Homo sapiens ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1) (RAC1), transcript variant Rac1, mRNA 2341 bp

>gi|156071503|ref|NM_006908.4|

chromosome: 7; Location: 7p2

CDS 242..820

Rac1 Q61L (A182T)

GGGAGGCCGGATGTGAGTGGAGCGGCCATTTCTGTTTCTCTGCAGTTTTCTCAGCTTTGGGTGGTGGC
CGCTGCCGGGCATCGGCTTCCAGTCCGCGGAGGGCGAGGCGGCGTGGACAGCGCCCCGGCACCAGCGC
CCCCGCCCGCAAGCCGCGCGCCCGTCCGCGCGCCCCGAGCCCCGCGCTTCTATCTCAGCGCCCTGC
CGCCGCGCGCGGCCAGCGAGCGGCCCTGATGCAGGCCATCAAGTGTGTGGTGGTGGGAGACGGAGCT
GTAGGTA AAACTTGCTACTGATCAGTTACACAACCAATGCATTTCTGGAGAATATATCCCTACTGTCT
TTGACAATTATTCTGCCAATGTTATGGTAGATGGAAAACCGGTGAATCTGGGCTTATGGGATACAGCTGG
ACAAGAAGATTATGACAGATTACGCCCCCTATCCTATCCGCAAACAGATGTGTTCTTAATTTGCTTTTCC
CTTGTGAGTCTGCATCATTTGAAAAATGTCGGTGCAAAGTGGTATCCTGAGGTGCGGCACCCTGTCCCA
ACACTCCCATCATCCTAGTGGGAACTAAACTTGATCTTAGGGATGATAAAGACACGATCGAGAACTGAA
GGAGAAGAAGCTGACTCCCATCACCTATCCG CAGGGTCTAGCCATGGCTAAGGAGATTGGTGTGTAAAA
TACCTGGAGTGTCTCGCGCTCACACAGCGAGGCTCAAGACAGTGTGTTGACGAAGCGATCCGAGCAGTCC
TCTGCCCCGCTCCCGTGAAGAAGAGGAAGAGAAAATGCCTGCTGTTGTAATGTCCTCAGCCCCCTCGTTCT
TGGTCTGTCCCTTGGAACTTTGTACGCTTTGCTCAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ACAACGGTGGAGCCTTCGCACTCAATGCCAACTTTTTGTTACAGATTAATTTTTCCATAAAACCATTTTT
TGAACCAATCAGTAATTTAAGGTTTTGTTTGTCTAAATGTAAGAGTTCAGACTCACATTCTATTA
TTTAGCCCTAAAATGACAAGCCTTCTTAAAGCCTTATTTTTCAAAGCGCCCCCCCCATTCTTGTTCAGA
TTAAGAGTTGCCAAAATACCTTCTGAACTACACTGCATTGTTGTGCCGAGAACACCGAGCACTGAACTTT
GCAAAGACCTTCGTCTTTGAGAAGACGGTAGCTTCTGCAGTTAGGAGGTGCAGACACTTGCTCTCCTATG
TAGTTCTCAGATGCGTAAAGCAGAACAGCCTCCCGAATGAAGCGTTGCCATTGAACTCACCAGTGAGTTA
GCAGCACGTGTTCCCGACATAACATTTGACTGTAATGGAGTGAGCGTAGCAGCTCAGCTCTTTGGATCAG
TCTTTGTGATTTTCATAGCGAGTTTTCTGACCAGTTTTGCGGAGATTTTGAACAGA ACTGCTATTTCTC
TAATGAAGAATTCTGTTTAGCTGTGGGTGTGCCGGTGGGGTGTGTGTGATCAAAGGACAAAGACAGTAT
TTTGACAAAATACGAAGTGGAGATTTACTACTATTGTACAAGGAATGAAAGTGTACGGGTAAAACTC
TAAAAGGTTAATTTCTGTCAAATGCAGTAGATGATGAAAGAAAGGTTGGTATTATCAGGAAATGTTTTCT
TAAGCTTTTCTTCTTACACCTGCCATGCCTCCCCAAATGGGCATTTAATTCATCTTTAACTGGT
TGTTCTGTTAGTCGCTAACTTAGTAAGTGCCTTTCTTATAGAACCCTTCTGACTGAGCAATATGCCTCC
TTGTATTATAAAATCTTCTGATAATGCATTAGAAGGTTTTTTTTGTCGATTAGTAAAAGTGCTTTCCATG
TTACTTTATTTCAGAGCTAATAAGTGCCTTCTTAGTTTTCTAGTAACTAGGTGTA AAAATCATGTGTTGC
AGCTTTATAGTTTTTAAAATATTTTAGATAATCTTAACTATGAACCTTCTTAACATCACTGTCTTGCC
AGATTACCGACACTGTCACCTTGACCAATACTGACCTCTTTACCTCGCCACGCGGACACACGCCTCCTG
TAGTCGCTTTGCCTATTGATGTTCCCTTTGGGTCTGTGAGGTTCTGTAAACTGTGCTAGTGCTGACGATGT
TCTGTACA ACTTAACTCACTGGCGAGAATACAGCGTGGGACCTTCAGCCACTACAACAGAATTTTTTAA
ATTGACAGTTGCAGAAATGTGGAGTGTTTTTACATTGATCTTTTGCTAATGCAATTAGCATTATGTTTTG

CATGTATGACTTAATAAATCCTTGAATCATA

Cdc42 (mRNA):

Homo sapiens cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa) (CDC42), transcript variant 2, mRNA

>gi|89903014|ref|NM_044472.2| 1530 bp

chromosome: 1; Location: 1p36.1

CDS 167..742

ACTTCCGCGGGCACCCTACTGTGCGTCTCCTGCGCGCTGACGTGAGGTGCGTGCCCTGTCCGGCAGCCG
AGGAGACCCCGCGCAGTGCTGCCAACGCCCCGGTGGAGAAGCTGAGGTCATCATCAGATTTGAAATATTT
AAAGTGATACAAAATATTTTCAGCAATGCAGACAATTAAGTGTGTTGTTGTGGGCGATGGTGCTGTTGG
TAAAACATGTCTCCTGATATCCTACACAACAAAATTTCCATCGGAATATGTACCGACTGTTTTTGAC
AACTATGCAGTCACAGTTATGATTGGTGGAGAACCATATACTCTTGGACTTTTTGATACTGCAGGGCAAG
AGGATTATGACAGATTACGACCGCTGAGTTATCCACAAACAGATGTATTTCTAGTCTGTTTTTCAGTGGT
CTCTCCATCTTCATTTGAAAACGTGAAAGAAAAGTGGGTGCCTGAGATAACTCACCCTGTCCAAAGACT
CCTTTCTTGCTTGTGGGACTCAAATGATCTCAGAGATGACCCCTCTACTATTGAGAACTTGCCAAGA
ACAAACAGAAGCCTATCACTCCAGAGACTGCTGAAAAGCTGGCCCGTGACCTGAAGGCTGTCAAGTATGT
GGAGTGTCTGCACTTACACAGAGAGGTCTGAAGAATGTGTTTGTGAGGCTATCCTAGCTGCCCTCGAG
CCTCCGAAACTCAACCCAAAAGGAAGTGTGTATATTCATAACTGTTTTCTCCTTCCCTTCTTTGCTGC
TGCTTCCTGTCCCACTACTGTAGAAAAGATCGTTTAAAAACAAAGGAATAAAACCATCCTGTTTGAAAGCC
TCTGCGTCTTTTTACTCACCACTTAGAGCAACCTCTGTATTAGTTTTTGATCAAGAATGCAATATCATA
TAAATTTTTTGTGATCAGTAGTCAAGTTGGACTTGTTTTAACGTTCTGCTGCTTGAGTTGCCTGATGCTC
AGAGCTTTTTGGTTGGATTACTATTGCAAAGGGAACCTGGTCTGGCTTTAAGAATGCCTCTTGGAGA
AAATAACAAGAGTTTTAACACTTCTAGATCTTAGTTCTAGATGGAGAAAGTAACACAAACATCATTTTAC
TCTTATGATCAATTGTTAATTGTAATTGCATGACAAACCTTATGGAAAAGGGGTGACCTAGTAGAGTGTA
ATGGGGAAGGGAGGATTCTTTTTCTGGTTTTCTTTGTGCGGTGAAACTTTGTGTTGCTGTTGCTTTGGCT
GTCTGTGCTGTAGTGGAGTATTTGTCAGTCTGGGGTGGGGAAGATATTGATGTATCTGCTACTGCTTTAT
GAGTTCATTTGTTACATTATCTTTTAAGAATAACATCCATTTAAACAGTTGACTTACAGTTTGTTAATGC
TGAGATGTAAAGCTGCCACCTTTATATTTTCTGCTTCTGATTTTATTGTGAGGGAAATATAACAATTGTG
GTTACCTTCAAATTTTGAAATTAATAATATAACAACCGTTTGTAAAAA

Cdc42 QL (mut) mRNA

Homo sapiens cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa) (CDC42), transcript variant 2, mRNA

>gi|89903014|ref|NM_044472.2| 1530 bp

chromosome: 1; Location: 1p36.1

CDS 167..742

Cdc42 Q61L (A182T)

ACTTCCGCGGGCACCCAACTGTGCGTCTCCTGCGCGCTGACGTGAGGTGCGTGCCCTGTCCGGCAGCCG
AGGAGACCCCGCGCAGTGCTGCCAACGCCCGGTGGAGAAGCTGAGGTCATCATCAGATTTGAAATATTT
AAAGTGGATACAAAATATTTTCAGCAATG CAGACAATTAAGTGTGTTGTTGTGGGCGATGGTGCTGTTGG
TAAAACATGTCTCTGATATCTTACACAACAAAATAATTTCCATCGGAATATGTACCGACTGTTTTTGAC
AACTATGCAGTCACAGTTATGATTGGTGGAGAACCATATACTCTTGGACTTTTTGATACTGCAGGGCAG
AGGATTATGACAGATTACGACCGCTGAGTTATCCACAAACAGATGTATTTCTAGTCTGTTTTTCAGTGGT
CTCTCCATCTTCATTTGAAAACGTGAAAGAAAAGTGGGTGCCCTGAGATAACTCACCCTGTCCAAAGACT
CCTTTCTTGCTTGTGGGACTCAAATGATCTCAGAGATGACCCCTCTACTATTGAGAACTTGCCAAGA
ACAAAACAGAAGCCTATCACTCCAGAGACTGCTGAAAAGCTGGCCCGTGACCTGAAGGCTGTCAAGTATGT
GGAGTGTCTGCACTTACACAGAGAGGTCTGAAGAATGTGTTTGATGAGGCTATCCTAGCTGCCCTCGAG
CCTCCGAAACTCAACCCAAAAGGAAGTGTGTATATTC TAA ACTGTTTTCTCCTTCCCTTCTTTGCTGC
TGCTTCCTGTCCCCTACTGTAGAAAGATCGTTTAAAAACAAAGGAATAAAACCATCCTGTTTGAAAGCC
TCTGCGTCTTTTTACTCACACCTTAGAGCAACCTCTGTATTAGTTTTTGATCAAGAATGCAATATCATA
TAAATTTTTTGTGATCAGTAGTCAAGTTGGACTTGTTTTAACTTCTGCTGCTTGAGTTGCCTGATGCTC
AGAGCTTTTTGGTTTGGATTACTATTGCAAAAGGAACTTGGTCTGGCTTTAAGAATGTCCTCTTGGAGA
AAATAACAAGAGTTTAACTTCTAGATCTTAGTCTAGATGGAGAAAGTAACACAAACATCATTTTAC
TCTTATGATCAATTGTTAATTGTAATTGCATGACAAACCTTATGGAAAAGGGGTGACCTAGTAGAGTGTA
ATGGGGAAGGGAGGATTCTTTTCTGGTTTTCTTTGTGCGGTGAACTTTGTGTTGCTGTTGCTTTGGCT
GTCTGTGCTGTAGTGGAGTATTTGTCAGTCTGGGGTGGGGAAGATATTGATGTATCTGCTACTGCTTTAT
GAGTTCATTTGTTACATTATCTTTTAAAGATAACATCCATTTAAACAGTTGACTTACAGTTTGTAAATGC
TGAGATGTAAAGCTGCCACCTTTATATTTTCTGCTTCTGATTTTATTGTGAGGAAATATACAATTGTG
GTTACCTTCAAATTTTGAAATTAATAATATAACAACCGTTTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Rnd1 (mRNA)

Homo sapiens small GTP binding protein Rho6 (Rho6) mRNA, complete cds

AF498967.1 GI:20379107

Chromosome: 12; Location: 12q12-q13

CDS 1..699

ATGAAGGAGAGACGGGCCCCCAGCCAGTCGTGGCCAGATGTAAGCTCGTTCGGTCCGGGACGTGCAGT
GTGGGAAGACCGCGATGTTGCAAGTGTAGCGAAGGATTGCTATCCAGAGACCTATGTGCCACCGTGT
CGAAAATTACACAGCCTGTTTGGAGACAGAGAACAGAGGGTGGAGCTTAGTCTCTGGGATACCTCAGGA
TCTCCCTACTACGATAATGTCCGTCCACTCTGCTACAGCGACTCGGATGCAGTATTACTATGTTTTGACA
TCAGCCGTCCAGAGACAGTGGACAGCGCACTCAAGAAGTGGAGGACAGAAATCCTAGATTATTGTCCAG
CACCCGCTTTTGCTCATTTGGCTGCAAGACAGACCTGCGAACAGACCTGAGTACTCTGATGGAGCTGTCC
CACCAGAAGCAGGCGCCCATCTCCTATGAGCAGGGTTGTGCAATAGCAAAGCAGCTGGGTGCAGAAATCT
ACCTGGAAGGCTCAGCTTTCACCTCAGAAAAGAGCATCCACAGCATCTTTCGGACGGCATCCATGCTGTG
TCTGAACAAGCCTAGCCCACTGCCCCAGAAGAGCCCTGTCCGAAGCCTCTCCAACGACTGCTCCACCTC
CCGAGTCGCTCTGAACTCATCTCTTCTACCTTCAAGAAGGAAAAGGCCAAAAGCTGTTCCATTATG TGA

Rnd2 (mRNA):

Homo sapiens small GTP binding protein Rho7 (Rho7) mRNA, complete cds>gi|20379109|gb|AF498968.1

Chromosome: 17; Location: 17q21

CDS 1..684

```
ATGAGAGGGCAGAGCGGCCGCTGCAAGATCGTGGTGGTGGGAGACGCAGAGTGCAGCAAGACGGCGCTGC
TGCAGGTGTTTCGCCAAGGACGCCTATCCCGGGAGTTATGTCCCCACCGTGTTTGAGAACTACACTGCGAG
CTTTGAGATCGACAAGCGCCGATGAGCTCAACATGTGGGACACTTCAGGTTCTCTTACTATGATAAT
GTCCGGCCTCTGGCCTATCCTGATTCTGATGCTGTGCTCATCTGCTTCGACATTAGCCGACCAGAAACAC
TGGACAGTGTCTCAAGAAGTGGCAAGGAGAGACTCAAGAGTCTGCCCAATGCCAAGGTTGTGCTGGT
TGGCTGTAAACTGGACATGCGGACTGACCTGGCCACACTGAGGGAGCTGTCCAAGCAGAGGCTTATCCCT
GTTACACATGAGCAGGGCACTGTGCTGGCCAAGCAGGTGGGGGCTGTGTCTATGTTGAGTGCTCCTCCC
GGTCTCTGAGCGCAGCGTCAGGGATGTCTTCCATGTGGCTACAGTGGCCTCCCTTGCCGTGGCCATAG
GCAGCTGCGCCGAACTGACTCACGCCGGGGAATGCAGCGATCCGCTCAGCTGTGAGGACGGCCAGACCGG
GGGAATGAGGGCGAGATACACAAGGATCGAGCCAAAAGCTGCAACCTCATGTGA
```

Rnd3 (mRNA):

Homo sapiens small GTP binding protein Rho8 (Rho8) mRNA, complete cds >gi|20379111|gb|AF498969.1|

Chromosome: 2; Location: 2q23.3

CDS 1..735

```
ATGAAGGAGAGAAGAGCCAGCCAGAAATTATCCAGCAAATCTATCATGGATCCTAATCAGAACGTGAAAT
GCAAGATAGTTGTGGTGGGAGACAGTCAGTGTGGAAAACTGCGCTGCTCCATGTCTTCGCCAAGGACTG
CTTCCCCGAGAATTACGTTCTTACAGTGTGAGAAATTACACGGCCAGTTTTGAAATCGACACACAAAGA
ATAGAGTTGAGCCTGTGGGACACTTCGGGTTCTCTTACTATGACAATGTCCGCCCCCTCTCTTACCCTG
ATTCCGATGCTGTGCTGATTTGCTTTGACATCAGTAGACCAGAGACCCTGGACAGTGTCTCAAAAAGTG
GAAAGGTGAAATCCAGGAATTTTGTCCAAATACCAAATGCTCTTGGTCCGGCTGCAAGTCTGATCTGCGG
ACAGATGTTAGTACATTAGTAGAGCTCTCCAATCACAGGCAGACGCCAGTGTCTTATGACCAGGGGGCAA
ATATGGCCAAACAGATTGGAGCAGCTACTTATATCGAATGCTCAGCTTTACAGTCGGAAAATAGCGTCAG
AGACATTTTTTACGTTGCCACCTTGGCATGTGTAATAAGACAAATAAAAACGTTAAGCGGAACAAATCA
CAGAGAGCCACAAAGCGGATTTACACATGCCTAGCAGACCAGAACTCTCGGCAGTTGCTACGGACTTAC
GAAAGGACAAAAGCGAAGAGCTGCACTGTGATGTGA
```

Rock1 wt mRNA:

Homo sapiens Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK1), mRNA

>gi|112382209|ref|NM_005406.2| 6650 bp

chromosome: 18; Location: 18q11.1

CDS 942..5006

GCTGGTTCCCCTTCCGAGCGTCCGCGCCCCGCATGCGCAGTCTGCCCCGGCGGTCTCCGTTTGTTTGAAC
AGGAAGGCGGACATATTAGTCCCTCTCAGCCCCCTCGCCCCACCCCCAGGCATTGCGCGCCGCGACTC
GCCCTTTCCCCGGCTGGGACCGCAGCCCCTCCAGAAGCTCCCCATCAGCAGCCCGGGACCCAACTA
TCGTCTTCCCTCTTCGCCCCGCTCTCCAGCCTTTCTCTGCTAAGTCTCCATCGGGCATCGACCTCGCCCTG
CCCCACCGGACACCGTAGCAGCAGCCCCAGCAGCGACGGGACAAAATGGGAGAGTGAGGCTGTCTGCGT
GGACCAGCTCGTGGCCGAGACTGATCGGTGCGTCTGGGCCGGGCCGAGTAGAGCCGGGGACGCGGGGCTAG
ACCGTCTACAGCGCCTCTGAGCGGAGCGGGCCCCGGCCCGTGGCCCCGAGCGGCGGCCGAGCTGGCACAGC
TCCTCACCCGCCCTTTGCTTTGCGCTTTCTCTTCTCCCTCCCTTGTGCCCCGAGGGAGTCTCCACCCT
GCTTCTCTTTCTCTACCCGCTCCTGCCATCTCGGGACGGGGACCCCTCCATGGCGACGGCGGCCGGGGC
CCGCTAGACTGAAGCACCTCGCCGGAGCGACGAGGCTGGTGGCGACGGCGCTGTTCGGCTGTTCGTGAGGGG
CTGCCGGGTGGGATGCGACTTTGGGGCTCCGAGCGGCTGTGGGTTCGCTGTTGCCCCCGGCCCGGGGTCTG
GAGAGCGGAGGTCCCTCAGTGAGGGGAAGACGGGGGAACCGGGCGCACCTGGTGACCCTGAGGTTCCGG
CTCCTCCGCCCCGGGCTGCGAACCACCGGGAGGAAGTTGGTTGAAATTGCTTTCCGCTGCTGGTGCT
GGTAAGAGGGCATTGTACAGCAGCAGCAACATGTCGACTGGGGACAGTTTTGAGACTCGATTTGAAAAA
ATGGACAACCTGCTGCGGGATCCCAAATCGGAAGTGAATTCGGATTGTTTGCTGGATGGATTGGATGCTT
TGGTATATGATTTGGATTTTCTCGCCTTAAGAAAAACAAAAATATTGACAACTTTTTAAGCAGATATAA
AGACACAATAAAATAAATCAGAGATTTACGAATGAAAGCTGAAGATTATGAAGTAGTGAAGGTGATTGGT
AGAGGTGCATTTGGAGAAAGTTCAATTGGTAAGGCATAAATCCACCAGGAAGGTATATGCTATGAAGCTTC
TCAGCAAATTTGAAATGATAAAGAGATCTGATTCGCTTTTTTCTGGGAAGAAAGGGACATCATGGCTTT
TGCCAACAGTCCCTGGGTGTTTTCAGCTTTTTTATGCATTCCAAGATGATCGTTATCTCTACATGGTGATG
GAATACATGCCTGGTGGAGATCTTGTAACCTAATGAGCAACTATGATGTGCCGAAAAATGGGCACGAT
TCTATACTGCAGAAGTAGTTCTTGCATTGGATGCAATCCATTCATGGGTTTTATTACAGAGATGTGAA
GCCTGATAACATGCTGCTGGATAAATCTGGACATTTGAAGTTAGCAGATTTTGGTACTTGTATGAAGATG
AATAAGGAAGGCATGGTACGATGTGATACAGCGGTTGGAACACCTGATTATATTTCCCCTGAAGTATTAA
AATCCCAAGGTGGTGTGTTTATGGAAGAGAATGTGACTGGTGGTTCGGTTGGGGTATTTTTATACGA
AATGCTTGTAGGTGATACACCTTTTTATGCAGATTCCTTGGTTGGAACCTACAGTAAAATTATGAACCAT
AAAAATTCACCTTACCTTTCTGATGATAATGACATATCAAAGAAGCAAAAAACCTTATTTGTGCCTTCC
TTACTGACAGGGAAGTGAGGTTAGGGCGAAATGGTGTAGAAGAAATCAAACGACATCTCTTCTTCAAAA
TGACCAGTGGGCTTGGGAAAACGCTCCGAGACACTGTAGCACCAGTTGTACCCGATTTAAGTAGTGACATT
GATACTAGTAATTTTGTGACTTGGGAAGAAGATAAAGGAGAGGAAGAAACATTCCTATTCCTAAAGCTT
TCGTTGGCAATCAACTACCTTTTGTAGGATTTACATATTATAGCAATCGTAGATACTTATCTTCAGCAA
TCCTAATGATAACAGAAGTAGCTCCAATGCAGATAAAAGCTTGCAAGAAAGTTTGCAAAAAACAATCTAT

AAGCTGGAAGAACAGCTGCATAATGAAATGCAGTTAAAAGATGAAATGGAGCAGAAGTGCAGAACCTCAA
ACATAAAACTAGACAAGATAATGAAAGAATTGGATGAAGAGGGAAATCAAAGAAGAAATCTAGAATCTAC
AGTGTCTCAGATTGAGAAGGAGAAAAATGTTGCTACAGCATAGAATTAATGAGTACCAAAGAAAAGCTGAA
CAGGAAAAATGAGAAGAGAAGAAATGTAGAAAAATGAAGTTTCTACATTAAGGATCAGTTGGAAGACTTAA
AGAAAGTCAGTCAGAATTCACAGCTTGCTAATGAGAAGCTGTCCCAGTTACAAAAGCAGCTAGAAGAAGC
CAATGACTTACTTAGGACAGAATCGGACACAGCTGTAAGATTGAGGAAGAGTCACACAGAGATGAGCAAG
TCAATTAGTCAGTTAGAGTCCCTGAACAGAGAGTTGCAAGAGAGAAATCGAATTTTAGAGAATTCTAAGT
CACAAAACAGACAAAAGATTATTACCAGCTGCAAGCTATATTAGAAGCTGAACGAAGAGACAGAGGTCATGA
TTCTGAGATGATTGGAGACCTTCAAGCTCGAATTACATCTTTACAAGAGGAGGTGAAGCATCTCAAACAT
AATCTCGAAAAAGTGGAAAGGAGAAAAGAAAAGAGGCTCAAGACATGCTTAATCACTCAGAAAAGGAAAAGA
ATAATTTAGAGATAGATTTAAACTACAACTTAAATCATTACAACAACGGTTAGAACAAGAGGTAAATGA
ACACAAAGTAACCAAAGCTCGTTTAACTGACAAACATCAATCTATTGAAGAGGCAAAGTCTGTGGCAATG
TGTGAGATGGAAGAAAAAGCTGAAAGAAGAAAGAGAAGCTCGAGAGAAGGCTGAAAATCGGGTTGTTTCAGA
TTGAGAAAACAGTGTTCATGCTAGACGTTGATCTGAAGCAATCTCAGCAGAACTAGAACATTTGACTGG
AAATAAAGAAAAGGATGGAGGATGAAGTTAAGAATCTAACCCTGCAACTGGAGCAGGAATCAAATAAGCGG
CTGTTGTTACAAAATGAATTGAAGACTCAAGCATTTGAGGCAGACAATTTAAAAGGTTTAGAAAAGCAGA
TGAAACAGGAAAATAAATACTTTATTGGAAGCAAAGAGATTATTAGAATTTGAGTTAGCTCAGCTTACGAA
ACAGTATAGAGGAAATGAAGGACAGATGCGGGAGCTACAAGATCAGCTTGAAGCTGAGCAATATTTCTCG
ACACTTTATAAAAACCCAGGTAAGGAACCTAAAGAAGAAATGAAGAAAAAACAGAGAAAATTTAAAGA
AAATACAGGAACTACAAAATGAAAAAGAACTCTTGCTACTCAGTTGGATCTAGCAGAAACAAAAGCTGA
GTCTGAGCAGTTGGCGCAGGCCTTCTGGAAGAACAGTATTTTGAATTGACGCAAGAAAGCAAGAAAGCT
GCTTCAAGAAATAGACAAGAGATTACAGATAAAGATCACACTGTTAGTCCGCTTGAAGAAGCAAACAGCA
TGCTAACCAAAGATATTGAAATATTAAGAAGAGAGAATGAAGAGCTAACAGAGAAAATGAAGAAGGCAGA
GGAAGAATATAAACTGGAGAAGGAGGAGGAGATCAGTAATCTTAAGGCTGCCTTTGAAAAGAATATCAAC
ACTGAACGAACCCCTTAAAACACAGGCTGTTAACAAATTGGCAGAAATAATGAATCGAAAAGATTTTAAAA
TTGATAGAAAAGAAAGCTAATACACAAGATTTGAGAAAAGAAAAGAAAATCGAAAGCTGCAACTGGA
ACTCAACCAAGAAAAGAGAGAAAATCAACCAGATGGTAGTGAACATCAGAAGGAAGTGAATGACATGCAA
GCGCAATTGGTAGAAGAATGTGCACATAGGAATGAGCTTCAGATGCAGTTGGCCAGCAAAGAGAGTGATA
TTGAGCAATTGCGTGCTAACTTTTGGACCTCTCGGATCTACAAGTGTGCTAGTTTTCTTAGTGCTGA
TGAAACTGATGGTAACCTCCAGAGTCAAGAATTGAAGGTTGGCTTTCAGTACCAAATAGAGGAAATATC
AAACGATATGGCTGGAAGAAACAGTATGTTGTGGTAAGCAGCAAAAAAATTTTGTCTATAATGACGAAC
AAGATAAGGAGCAATCCAATCCATCTATGGTATTGGACATAGATAAACTGTTTCACGTTAGACCTGTAAC
CCAAGGAGATGTGTATAGAGCTGAACTGAAGAAATTCCTAAAATATTCAGATACTATATGCAAATGAA
GGTGAATGTAGAAAAGATGTAGAGATGGAACCAGTACAACAAGCTGAAAAACTAATTTCCAAAATCACA
AAGGCCATGAGTTTATTCTTACACTTACCCTTCTGCAATTTGTGATGCCTGTGCCAAACCTCTCTG
GCATGTTTTTAAGCCACCCCTGCCCTAGAGTGTGCAAGATGCCATGTTAAGTGCCACAGAGATCACTTA
GATAAGAAAAGAGGACTTAATTTGTCCATGTAAAGTAAGTTATGATGTAACATCAGCAAGAGATATGCTGC
TGTTAGCATGTTCTCAGGATGAACAAAAAAAATGGGTAACCTCATTTAGTAAAGAAAATCCCTAAGAATCC
ACCATCTGGTTTTGTTCTGTGCTTCCCCTCGAACGCTTTCTACAAGATCCACTGCAAATCAGTCTTTCCGG
AAAGTGGTCAAAAATACATCTGAAAAAACTAGTTAAACCATGTGACTGAGTGCCTGTGGAATCGTGTGGG
ATGCTACCTGATAAACAGGCTTCTTTAACCATGCAGAGCAGACAGGCTGTTTCTTTGACACAAAATATCA

CAGGCTTCAGGGTTAAGATTGCTGTTTTTCTGTCCCTTGCCTTGGCACAACACACTGAGGGTTTTTTTTTAT
TGCGGGTTTGCCACAGGTAGATTAGATTAATTATTACTATGTAATGCAAGTACAGTTGGGGGAAAGCTT
AGGTAGATATATTTTTTTTTAAAAGGTGCTGCCCTTTTGGATTTATAAGAAAATGCCTGTCAGTCGTGATA
GAACAGAGTTTTCTCATATGAGTAAGAGGAAGGGACTTTCACCTTCAAGTGAACAGCCATCACTATCA
AGATCAGCTCATGGAAGGAGTAAAGAAAATATCTCAAAATGAGACAAACTGAAGTTTTGTTTTTTTTTTA
ATGACTTAAGTTTTTGTGCTCTTGCAAGACTATACAAAACATTTTTAAGAAAGCAGTGATATCACTTGAA
CTTCAGTGCCCTCACTGTAGAATTTAAAAGCCTTACTGTTGATTGCCCATGTTGGACTTGATGGAGAAAT
TAAATATCTTTTCATTATGCTTTACAAAATACTGTATATGTTTCAGCAAGTTTGGGGAATGGGAGAGGACA
AAAAAAAGTTACATTTAATCTATGCATTTTTGCCAAGCCATATTGAGTTATTTTACTACTAGAGACATTA
GGAAACTAACTGTACAAAAGAACCAAGTTTAAAAGCATTTTTGTGGGGTACATCATTTCTATAATTGTATA
ATGTATTTCTTTGTGGTTTTAAATGATAAAGACATTAAGTTAACAAACATATAAGAAATGTATGCACTGT
TTGAAATGTAAATTATCTTAGAACACTTTCAATGGGGTTGCATTGTCCTTTTAGTGCCTTAATTTGAG
ATAATTATTTTACTGCCATGAGTAAGTATAGAAATTTCAAAAAATGTATTTTCAAAAAATTATGTGTGC
AGTGAGTTTTTCATTGATAAATTGGTTTTAATTTAAAATATTTAGAGGTTTTGTTGGACTTTCATAAATTGAG
TACAATCTTTGCATCAAACTACCTGCTACAATAATGACTTTATAAACTGCAAAAAATGTAGAAGGTTGC
ACCAACATAAAAAAGGAAATATGGCAATACATCCATGATGTTTTCCAGTTAACATAGGAATTACCAGATAA
ATACTGTAAACTCTTGTCCAGTAACAAGAGTTGATTCATATGGACAGTATGATTTATTGTTTATTTTTT
TAACCAAAATACCTCCTCAGTAATTTATAATGGCTTTGCAGTAATGTGTATCAGATAAGAAGCACTGGAAA
ACCGATCGTCTCTAGGATGATATGCATGTTTCAAGTGGTATTGAAAGCCGCACTGATGGATATGTAATAA
TAAACATATCTGTTATTAATATACTAATGACTCTGTGCTCATTTAATGAGAAATAAAAGTAATTTATGGA
TGGGTATCTTTAATTTTTTACTGCAATGTGTTTTCTCATGGCTGAAATGAATGGAAAACATACTTCAAATT
AGTCTCTGATTGTATATAAATGTTTGTGAAATCCATGGTTAGATTAAGTGTATTTTTTAAAAGATAAAA

Rock1 Δ3 (mut) mRNA:

Homo sapiens Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK1)
Δ3 (deletion 942-3123), mRNA

>gi|112382209|ref|NM_005406.2| 6650 bp

chromosome: 18; Location: 18q11.1

CDS 942..5006

GCTGGTTCCCCTTCGAGCGTCCGCGCCCCGCATGCGCAGTCTGCCCCGGCGGTCTCCGTTTGTGTTGAAC
AGGAAGGCGGACATATTAGTCCCTCTCAGCCCCCTCGCCCCACCCCCAGGCATTGCGCCGCCGCGACTC
GCCCTTTCCCCGGCTGGGACCGCAGCCCCCTCCAGAAGCTCCCCATCAGCAGCCGCCGGGACCCAATA
TCGTCTTCTCTTCGCCCCTCTCCAGCCTTTCTCTGCTAAGTCTCCATCGGGCATCGACCTCGCCCTG
CCCCACCGGACACCGTAGCAGCAGCCCCAGCAGCGACGGGACAAAATGGGAGAGTGAGGCTGTCCTGCGT
GGACCAGCTCGTGGCCGAGACTGATCGGTGCGTCGGGCCGGGCGAGTAGAGCCGGGGACGCGGGGCTAG

ACCGTCTACAGCGCCTCTGAGCGGAGCGGGCCCGGCCCGTGGCCCGAGCGGCGGCCGAGCTGGCACAGC
TCCTCACCCGCCCTTTGCTTTTCGCCTTTCTCTTCTCCCTCCCTTGTGGCCCGGAGGGAGTCTCCACCCT
GCTTCTCTTTCTCTACCCGCTCCTGCCCATCTCGGGACGGGGACCCCTCCATGGCGACGGCGGCCGGGGC
CCGCTAGACTGAAGCACCTCGCCGGAGCGACGAGGCTGGTGGCGACGGCGCTGTGGCTGTCTGTGAGGGG
CTGCCGGGTGGGATGCGACTTTGGGCGTCCGAGCGGCTGTGGGTGCTGTGGCCCCGGCCCGGGTCTG
GAGAGCGGAGGTCCCTCAGTGAGGGGAAGACGGGGGAACCGGGCGCACCTGGTGACCCTGAGGTTCCGG
CTCCTCCGCCCGCGGCTGCGAACCACCGCGGAGGAAGTTGGTTGAAATTGCTTTCCGCTGCTGGTGCT
GGTAAGAGGGCATTGTACACGCAGCAGCAACATG-----
-----AACAGAACTAGCTCCAATGCAGATAAAAAGCTTGCAGGAAAGTTGCAAAAAACAATCTAT
AAGCTGGAAGAACAGCTGCATAATGAAATGCAGTTAAAAGATGAAATGGAGCAGAAGTGCAGAACCTCAA
ACATAAAACTAGACAAGATAATGAAAGAATTGGATGAAGAGGGAAATCAAAGAAGAAATCTAGAATCTAC
AGTGTCTCAGATTGAGAAGGAGAAAAATGTTGCTACAGCATAGAATTAATGAGTACCAAAGAAAAGCTGAA
CAGGAAAATGAGAAGAGAAGAAATGTAGAAAATGAAGTTTCTACATTAAGGATCAGTTGGAAGACTTAA
AGAAAAGTCAAGTACAGATTTCACAGCTTGCTAATGAGAAGCTGTCCAGTTACAAAAGCAGCTAGAAGAAGC
CAATGACTTACTTAGGACAGAAATCGGACACAGCTGTAAGATTGAGGAAGAGTCACACAGAGATGAGCAAG
TCAATTAGTCAAGTTCAGTCCCTGAACAGAGAGTTGCAAGAGAGAAATCGAATTTTAGAGAATTCTAAGT
CACAAACAGACAAAGATTATTACCAGCTGCAAGCTATATTAGAAGCTGAACGAAGAGACAGAGGTCATGA
TTCTGAGATGATTGGAGACCTTCAAGCTCGAATTACATCTTTACAAGAGGAGGTGAAGCATCTCAAACAT
AATCTCGAAAAAGTGGAAAGGAGAAAAGAGGCTCAAGACATGCTTAATCACTCAGAAAAGGAAAAGA
ATAATTTAGAGATAGATTTAAACTACAACTTAAATCATTACAACAACGGTTAGAACAAGAGGTAAATGA
ACACAAAAGTAACCAAAGCTCGTTTAACTGACAAACATCAATCTATTGAAGAGGCAAAGTCTGTGGCAATG
TGTGAGATGGAAAAAAGCTGAAAAGAAAAGAGAAGCTCGAGAGAAGGCTGAAAATCGGGTTGTTTCTGAG
TTGAGAAAACAGTGTTCATGCTAGACGTTGATCTGAAGCAATCTCAGCAGAACTAGAACATTTGACTGG
AAATAAAGAAAGGATGGAGGATGAAGTTAAGAATCTAACCCTGCAACTGGAGCAGGAATCAAATAAGCGG
CTGTTGTTACAAAATGAATTGAAGACTCAAGCATTTGAGGCAGACAATTTAAAAGGTTTAGAAAAGCAGA
TGAAAACAGGAAAATAAATACTTTATTGGAAGCAAAGAGATTATTAGAATTTGAGTTAGCTCAGCTTACGAA
ACAGTATAGAGGAAATGAAGGACAGATGCGGGAGCTACAAGATCAGCTTGAAGCTGAGCAATATTTCTCG
ACACTTTATAAAACCAGGTAAAGGAACTTAAAGAAGAAATGAAGAAAAAACAGAGAAAATTTAAAGA
AAATACAGGAACTACAAAATGAAAAAGAACTCTTGCTACTCAGTTGGATCTAGCAGAAACAAAAGCTGA
GTCTGAGCAGTTGGCGCGAGGCCTTCTGGAAGAACAGTATTTTGAATTGACGCAAGAAAGCAAGAAAGCT
GCTTCAAGAAATAGACAAGAGATTACAGATAAAGATCACACTGTTAGTTCGGCTTGAAGAAGCAAACAGCA
TGCTAACCAAAGATATTGAAATATTAAGAAGAGAGAATGAAGAGCTAACAGAGAAAATGAAGAAGGCAGA
GGAAGAATATAAACTGGAGAAGGAGGAGGAGATCAGTAATCTTAAGGCTGCCTTTGAAAAGAATATCAAC
ACTGAACGAACCCTTAAAACACAGGCTGTTAACAAATTTGGCAGAAATAATGAATCGAAAAGATTTAAAA
TTGATAGAAAAGAAAGCTAATACACAAGATTGAGAAAAGAAAAGAAAATCGAAAGCTGCAACTGGA
ACTCAACCAAGAAAAGAGAGAAATCAACCAGATGGTAGTGAACATCAGAAGGAAGTGAATGACATGCAA
GCGCAATTGGTAGAAGAAATGTGCACATAGGAATGAGCTTCAGATGCAGTTGGCCAGCAAAGAGAGTGATA
TTGAGCAATTGCGTGCTAAACTTTTGGACCTCTCGGATTTCTACAAGTGTGCTAGTTTTCTTAGTGCTGA
TGAAACTGATGGTAACCTCCAGAGTCAAGAATTGAAGGTTGGCTTTTCAAGTACCAAATAGAGGAAATATC
AAACGATATGGCTGGAAGAAACAGTATGTTGTGGTAAGCAGCAAAAAAATTTTGTCTATAATGACGAAC
AAGATAAGGAGCAATCCAATCCATCTATGGTATTGGACATAGATAAACTGTTTTCAGTTAGACCTGTAAC

CCAAGGAGATGTGTATAGAGCTGAAACTGAAGAAATTCCTAAAATATTCAGATACTATATGCAAATGAA
GGTGAATGTAGAAAAGATGTAGAGATGGAACCGTACAACAAGCTGAAAAAATAATTTCCAAAATCACA
AAGGCCATGAGTTTATTCCTACACTCTACCACTTTCCTGCCAATTGTGATGCCTGTGCCAAACCTCTCTG
GCATGTTTTTAAAGCCACCCCTGCCCTAGAGTGTGCAAGATGCCATGTTAAGTGCCACAGAGATCACTTA
GATAAGAAAGAGGACTTAATTTGTCCATGTAAAGTAAGTTATGATGTAACATCAGCAAGAGATATGCTGC
TGTTAGCATGTTCTCAGGATGAACAAAAAATGGGTAACCTATTTAGTAAAGAAAATCCCTAAGAATCC
ACCATCTGGTTTTGTTCGTGCTTCCCTCGAACGCTTCTACAAGATCCACTGCAAATCAGTCTTTCCGG
AAAGTGGTCAAAAAATACATCTGGAAAACTAGTTAAACCATGTGACTGAGTGCCCTGTGGAATCGTGTGGG
ATGCTACCTGATAAACAGGCTTCTTTAACCATGCAGAGCAGACAGGCTGTTTTCTTTGACACAAATATCA
CAGGCTTCAGGGTTAAGATTGCTGTTTTTCTGTCCTTGCTTTGGCACAACACACTGAGGGTTTTTTTTAT
TGCGGGTTTGCTACAGGTAGATTAGATTAATTATTACTATGTAATGCAAGTACAGTTGGGGGAAAGCTT
AGGTAGATATATTTTTTTTAAAAGGTGCTGCCTTTTTGGATTATAAGAAAATGCCTGTCAGTCGTGATA
GAACAGAGTTTTCTCATATGAGTAAGAGGAAGGACTTTCACCTTCAAGTGGAACAGCCATCACTATCA
AGATCAGCTCATGGAAGGAGTAAAGAAAATATCTCAAAATGAGACAAACTGAAGTTTTGTTTTTTTTTTA
ATGACTTAAGTTTTTGTGCTCTTGCAAGACTATACAAAATATTTTAAGAAAGCAGTGATATCACTTGAA
CTTCAGTGCCCTCACTGTAGAATTTAAAAGCCTTACTGTTGATTGCCCATGTTGGACTTGATGGAGAAAT
TAAATATCTTTCATTATGCTTTACAAAATACTGTATATGTTTCAGCAAGTTTGGGGAATGGGAGAGGACA
AAAAAAGTTACATTTAATCTATGCATTTTTGCCAAGCCATATTGAGTTATTTTACTACTAGAGACATTA
GGAACTAACTGTACAAAAGAACCAAGTTTAAAAGCATTTTGTGGGTACATCATTTCTATAATTGTATA
ATGTATTTCTTTGTGGTTTTAAATGATAAAGACATTAAGTTAACAAACATATAAGAAATGTATGCACTGT
TTGAAATGTAATATTTCTTAGAACACTTCAATGGGGTTGCATTGTCCTTTTAGTGCCTTAATTTGAG
ATAATTATTTTACTGCCATGAGTAAGTATAGAAATTTCAAAAAATGTATTTTCAAAAAATTATGTGTGTC
AGTGAGTTTTTCATTGATAAATTGGTTAATTTAAAATATTTAGAGGTTTGTGGACTTTCATAAATTGAG
TACAATCTTTGCATCAAACTACCTGCTACAATAATGACTTTATAAACTGCAAAAAATGTAGAAGGTTGC
ACCAACATAAAAAAGGAAAATATGGCAATACATCCATGATGTTTTCCAGTTAACATAGGAATTACCAGATAA
ATACTGTTAACTCTTGTCAGTAACAAGAGTTGATTCATATGGACAGTATGATTTATTGTTTTTTTTTT
TAACCAAATACCTCCTCAGTAATTTATAATGGCTTTGCAGTAATGTGTATCAGATAAGAAGCACTGGAAA
ACCGATCGTCTTAGGATGATATGCATGTTTCAAGTGGTATTGAAAGCCGCACTGATGGATATGTAATAA
TAAACATATCTGTTATTAATATACTAATGACTCTGTGCTCATTTAATGAGAAATAAAAGTAATTTATGGA
TGGGTATCTTTAATTTTTTACTGCAATGTGTTTTCTCATGGCTGAAATGAATGGAAAACATACTTCAAATT
AGTCTCTGATTGTATATAAATGTTTGTGAAATTCATGGTTAGATTAAAGTGTATTTTTTAAAAGATAAAA

Rock1 KD (mut) mRNA:

Homo sapiens Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK1), mRNA

>gi|112382209|ref|NM_005406.2| 6650 bp
chromosome: 18; Location: 18q11.1

kinase-deficient mutant:

313-315: AAG(Lys) changes to GCA(Ala)

3025-3027: ATA(Ile) changes to GCA(Ala)

GCTGGTTCCCCTTCCGAGCGTCCGCGCCCCGCATGCGCAGTCTGCCCCGGCGGTCTCCGTTTGTGTTGAAC
AGGAAGGCGGACATATTAGTCCCTCTCAGCCCCCTCGCCCCACCCCCAGGCATTGCGCGCCGCGACTC
GCCCTTTCGCCGGCTGGGACCGCAGCCCCCTCCAGAAGCTCCCCATCAGCAGCCGCCGGGACCCAACTA
TCGTCTTCTCTTCGCCCCTCTCCAGCCTTTCCTCTGCTAAGTCTCCATCGGGCATCGACCTCGCCCTG
CCCCACCGGACACCGTAGCAGCAGCCCCAGCAGCGACGGGACAAAATGGGAGAGTGAGGCTGTCTGCGT
GGACCAGCTCGTGGCCGAGACTGATCGGTGCGTCCGGCCGGCCGAGTAGAGCCGGGGACGCGGGGCTAG
ACCGTCTACAGCGCCTCTGAGCGGAGCGGGCCCGGCCGTGGCCCGAGCGGCGGCCGAGCTGGCACAGC
TCCTCACCCGCCCTTTGCTTTGCGCTTTCCTCTTCTCCCTCCCTTGTGCCCCGAGGGAGTCTCCACCCT
GCTTCTCTTTCTCTACCCGCTCCTGCCATCTCGGGACGGGGACCCCTCCATGGCGACGGCGGCCGGGGC
CCGCTAGACTGAAGCACCTCGCCGGAGCGACGAGGCTGGTGGCGACGGCGCTGTCCGCTGTCTGAGGGG
CTGCCGGGTGGGATGCGACTTTGGGCGTCCGAGCGGCTGTGGGTGCGTGTGCCCCGGCCCGGGTCTG
GAGAGCGGAGGTCCCCCAGTGAGGGGAAGACGGGGAAACGGGCGCACCTGGTGACCCTGAGGTTCCGG
CTCTCCGCCCCCGGGCTGCGAACCACCGCGGAGGAAGTTGGTTGAAATTGCTTTCGCTGCTGGTGCT
GGTAAGAGGGCATTGTACAGCAGCAGCAACATGTCGACTGGGGACAGTTTTGAGACTCGATTTGAAAAA
ATGGACAACCTGCTGCGGGATCCCAAATCGGAAGTGAATTCGGATTGTTTGCTGGATGGATTGGATGCTT
TGGTATATGATTTGGATTTTCCTGCCTTAAGAAAAACAAAAATATTGACAACTTTTTAAGCAGATATAA
AGACACAATAAATAAAATCAGAGATTTACGAATGAAAGCTGAAGATTATGAAGTAGTGAAGGTGATTGGT
AGAGGTGCATTTGGAGAAGTTCAATTGGTAAGGCATAAATCCACCAGGAAGGTATATGCTATGGCACTTC
TCAGCAAATTTGAAATGATAAAGAGATCTGATTTCTGCTTTTTTCTGGGAAGAAAGGGACATCATGGCTTT
TGCCAACAGTCCCTGGGTGTTTCAGCTTTTTTATGCATTCCAAGATGATCGTTATCTCTACATGGTGATG
GAATACATGCCTGGTGGAGATCTTGTAACCTAATGAGCAACTATGATGTGCCTGAAAAATGGGCACGAT
TCTATACTGCAGAAGTAGTTCTTGCATTGGATGCAATCCATTCATGGGTTTTATTACAGAGATGTGAA
GCCTGATAACATGCTGCTGGATAAATCTGGACATTTGAAGTTAGCAGATTTTGGTACTTGTATGAAGATG
AATAAGGAAGGCATGGTACGATGTGATACAGCGTTGGAACACCTGATTATATTTCCCCTGAAGTATTAA
AATCCCAAGGTGGTGGATGGTTATTATGGAAGAGAATGTGACTGGTGGTCCGTTGGGGTATTTTTATACGA
AATGCTTGTAGGTGATACACCTTTTTATGCAGATTTCTTGGTTGGAACCTTACAGTAAAATTATGAACCAT
AAAAATTCACTTACCTTTCCTGATGATAATGACATATCAAAGAAGCAAAAAACCTTATTTGTGCCTTCC
TTACTGACAGGGAAGTGAGGTTAGGGCGAAATGGTGTAGAAGAAATCAAACGACATCTCTTCTCAA
TGACCAGTGGGCTTGGGAAACGCTCCGAGACACTGTAGCACCAGTTGTACCCGATTTAAGTAGTGACATT
GATACTAGTAATTTTGATGACTTGGGAAGAAGATAAAGGAGAGGAAGAAACATTCCTATTCCCTAAAGCTT
TCGTTGGCAATCAACTACCTTTTGTAGGATTTACATATTATAGCAATCGTAGATACTTATCTTCAGCAA
TCCTAATGATAACAGAACTAGCTCCAATGCAGATAAAAGCTTGCAGGAAAGTTTGCAAAAAACAATCTAT
AAGCTGGAAGAACAGCTGCATAATGAAATGCAGTTAAAAGATGAAATGGAGCAGAAGTGCAGAACCTCAA
ACATAAAACTAGACAAGATAATGAAAGAATTGGATGAAGAGGGAAATCAAAGAAGAAATCTAGAATCTAC
AGTGTCTCAGATTGAGAAGGAGAAAATGTTGCTACAGCATAGAATTAATGAGTACCAAAGAAAAGCTGAA
CAGGAAAATGAGAAGAGAAGAAATGTAGAAAATGAAGTTTCTACATTAAGGATCAGTTGGAAGACTTAA
AGAAAGTCAGTCAGAATTCACAGCTTGCTAATGAGAAGCTGTCCAGTTACAAAAGCAGCTAGAAGAAGC
CAATGACTTACTTAGGACAGAATCGGACACAGCTGTAAGATTGAGGAAGAGTCACACAGAGATGAGCAAG
TCAATTAGTCAGTTAGAGTCCCTGAACAGAGAGTTGCAAGAGAGAAATCGAATTTTAGAGAATTCTAAGT
CACAAACAGACAAAGATTATTACCAGCTGCAAGCTATATTAGAAGCTGAACGAAGAGACAGAGGTCATGA

TTCTGAGATGATTGGAGACCTTCAAGCTCGAATTACATCTTTACAAGAGGAGGTGAAGCATCTCAAACAT
AATCTCGAAAAAGTGGAAAGGAGAAAAGAGGCTCAAGACATGCTTAATCACTCAGAAAAGGAAAAGA
ATAATTTAGAGATAGATTTAAACTACAACTTAAATCATTACAACAACGGTTAGAACAAGAGGTAAATGA
ACACAAAAGTAACCAAAGCTCGTTTAACTGACAAACATCAATCTATTGAAGAGGCAAAGTCTGTGGCAATG
TGTGAGATGGAAAAAAGCTGAAAAGAAGAAAGAGAAGCTCGAGAGAAGGCTGAAAATCGGGTTGTTTCAGA
TTGAGAAAACAGTGTTCATGCTAGACGTTGATCTGAAGCAATCTCAGCAGAAACTAGAACATTTGACTGG
AAATAAAGAAAGGATGGAGGATGAAGTTAAGAATCTAACCTGCAACTGGAGCAGGAATCAAATAAGCGG
CTGTTGTTACAAAAATGAATTGAAGACTCAAGCATTTGAGGCAGACAATTTAAAAGGTTTAGAAAAGCAGA
TGAAAACAGGAAAATAAATACTTTATTGGAAGCAAAGAGATTATTAGAATTTGAGTTAGCTCAGCTTACGAA
ACAGTATAGAGGAAATGAAGGACAGATGCGGGAGCTACAAGATCAGCTTGAAGCTGAGCAATATTTCTCG
ACACTTTATAAAACCCAGGTAAAGGAACTTAAAGAAGAAATGAAGAAAAAACAGAGAAAATTTAAAGA
AAATACAGGAACTACAAAATGAAAAAGAACTCTTGCTACTCAGTTGGATCTAGCAGAAACAAAAGCTGA
GTCTGAGCAGTTGGCGCGAGGCCTTCTGGAAGAACAGTATTTTGAATTGACGCAAGAAAGCAAGAAAGCT
GCTTCAAGAAATAGACAAGAGATTACAGATAAAGATCACACTGTTAGTCGGCTTGAAGAAGCAAACAGCA
TGCTAACCAAAGATATTGAAAATATTAAGAAGAGAGAATGAAGAGCTAACAGAGAAAATGAAGAAGGCAGA
GGAAGAATATAAACTGGAGAAGGAGGAGGAGATCAGTAATCTTAAGGCTGCCTTTGAAAAGAATATCAAC
ACTGAACGAACCCTTAAAACACAGGCTGTTAACAAATGGCAGAA **SCA** ATGAATCGAAAAGATTTAAAA
TTGATAGAAAAGAAAGCTAATACACAAGATTTGAGAAAAGAAAAGGAAAATCGAAAGCTGCAACTGGA
ACTCAACCAAGAAAAGAGAGAAATCAACCAGATGGTAGTGAAACATCAGAAGGAACTGAATGACATGCAA
GCGCAATTTGGTAGAAGAAATGTGCACATAGGAATGAGCTTCAGATGCAGTTGGCCAGCAAAGAGAGTGATA
TTGAGCAATTTGCGTGCTAAACTTTTGGACCTCTCGGATTTCTACAAGTGTGCTAGTTTTCTTAGTGCTGA
TGAAACTGATGGTAACCTCCAGAGTCAAGAATTGAAGGTTGGCTTTCAGTACCAAATAGAGGAAATATC
AAACGATATGGCTGGAAGAAACAGTATGTTGTGGTAAGCAGCAAAAAAATTTTGTTCATAATGACGAAC
AAGATAAGGAGCAATCCAATCCATCTATGGTATTGGACATAGATAAACTGTTTCACGTTAGACCTGTAAC
CCAAGGAGATGTGTATAGAGCTGAACTGAAGAAATTCCTAAAATATTCCAGATACTATATGCAAATGAA
GGTGAATGTAGAAAAGATGTAGAGATGGAACCAGTACAACAAGCTGAAAAAACTAATTTCCAAAATCACA
AAGGCCATGAGTTTATTCCTACACTCTACCACTTTCTCGCAATTTGTGATGCCTGTGCCAAACCTCTCTG
GCATGTTTTTAAGCCACCCCTGCCCTAGAGTGTGCAAGATGCCATGTTAAGTGCCACAGAGATCACTTA
GATAAGAAAGAGGACTTAATTTGTCCATGTAAAGTAAGTTATGATGTAACATCAGCAAGAGATATGCTGC
TGTTAGCATGTTCTCAGGATGAACAAAAAAAATGGGTAACCTCATTTAGTAAAGAAAATCCCTAAGAATCC
ACCATCTGGTTTTTGTTCGTGCTTCCCTCGAACGCTTTCTACAAGATCCACTGCAAATCAGTCTTTCCGG
AAAGTGGTCAAAAAATACATCTGGAAAACTAGT **TAA** CCATGTGACTGAGTGCCCTGTGGAATCGTGTGGG
ATGCTACCTGATAAAACCAGGCTTCTTTAACCATGCAGAGCAGACAGGCTGTTTCTTTGACACAAATATCA
CAGGCTTCAGGGTTAAGATTGCTGTTTTTCTGTCCCTTGCTTTGGCACAACACACTGAGGGTTTTTTTTAT
TGCGGGTTTGCTACAGGTAGATTAGATTAATTATTACTATGTAATGCAAGTACAGTTGGGGGAAAGCTT
AGGTAGATATATTTTTTTTAAAAGGTGCTGCCTTTTTGGATTTATAAGAAAATGCCTGTGATCGTGATA
GAACAGAGTTTTCTCATATGAGTAAGAGGAAGGACTTTCACTTTCAAGTGAACAGCCATCACTATCA
AGATCAGCTCATGGAAGGAGTAAAGAAAATATCTCAAAATGAGACAACTGAAGTTTTGTTTTTTTTTTA
ATGACTTAAGTTTTTGTGCTCTTGCAAGACTATACAAAATATTTTTAAGAAAGCAGTGATATCACTTGAA
CTTCAGTGCCCTCACTGTAGAAATTTAAAAGCCTTACTGTTGATTGCCATGTTGGACTTGATGGAGAAAT
TAAATATCTTTCATTATGCTTTACAAAATACTGTATATGTTTCAGCAAGTTTGGGGAATGGGAGAGGACA

AAAAAAGTTACATTTAATCTATGCATTTTTGCCAAGCCATATTGAGTTATTTTACTACTAGAGACATTA
GGAAACTAACTGTACAAAAGAACCAAGTTTAAAAGCATTTTGTGGGGTACATCATTTCTATAATTGTATA
ATGTATTTCTTTGTGGTTTTAAATGATAAAGACATTAAGTTAACAAACATATAAGAAATGTATGCACTGT
TTGAAATGTAAATTATTTCTTAGAACACTTTCAATGGGGGTTCATTGTCCTTTTAGTGCCTTAATTTGAG
ATAATTATTTTACTGCCATGAGTAAGTATAGAAATTTCAAAAAATGTATTTTCAAAAAATTATGTGTGTC
AGTGAGTTTTTCATTGATAATTGGTTTAATTTAAAATATTTAGAGGTTTGTGGACTTTCATAAATTGAG
TACAATCTTTGCATCAAACCTACCTGCTACAATAATGACTTTATAAACTGCAAAAAATGTAGAAGGTTGC
ACCAACATAAAAAAGGAAATATGGCAATACATCCATGATGTTTTCCAGTTAACATAGGAATTACCAGATAA
ATACTGTTAAACTCTTGTCAGTAACAAGAGTTGATTCATATGGACAGTATGATTTATTGTTTTTTTTT
TAACCAAATACCTCCTCAGTAATTTATAATGGCTTTGCAGTAATGTGTATCAGATAAGAAGCACTGGAAA
ACCGATCGTCTCTAGGATGATATGCATGTTTCAAGTGGTATTGAAAGCCGCACTGATGGATATGTAATAA
TAAACATATCTGTTATTAATATACTAATGACTCTGTGCTCATTTAATGAGAAATAAAAGTAATTTATGGA
TGGGTATCTTTAATTTTTACTGCAATGTGTTTTCTCATGGCTGAAATGAATGGAAAACATACTTCAAATT
AGTCTCTGATTGTATATAAATGTTTGTGAAATTCATGGTTAGATTAAAGTGTATTTTTAAAAGATAAAA